



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Generación de nuevos modelos animales para el estudio de la enfermedad de Alzheimer

Diego Muñoz Santos

Madrid, 2012



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Tesis Doctoral titulada:

Generación de nuevos modelos animales para el estudio de la enfermedad de Alzheimer

Presentada por: **Diego Muñoz Santos**

Licenciado en Bioquímica, Universidad Autónoma de Madrid

Para optar al Grado de Doctor

Directores de tesis:

Dr. Lluís Montoliu José (CNB-CSIC)

y

Prof. Fernando Valdivieso Amate (CBMSO-UAM/CSIC)

Campus de Excelencia UAM+CSIC

Madrid, 2012

Esta tesis doctoral ha sido realizada por Diego Muñoz Santos en el laboratorio “Modelos Animales por Manipulación Genética” del Departamento de Biología Molecular y Celular, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), y en el laboratorio “Patología molecular de la enfermedad de Alzheimer” del Departamento de Neurobiología Molecular del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO-CSIC/UAM), bajo la supervisión del Dr. Lluís Montoliu José, Investigador Científico del CSIC y del Prof. Fernando Valdivieso Amate, Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular, respectivamente.



Las siguientes ayudas han permitido la realización de la presente Tesis Doctoral:

- Proyecto de la Obra Social de Caja de Madrid (AFAL – Asociación para las Familias con Alzheimer) sobre “Búsqueda de genes de susceptibilidad para la enfermedad de Alzheimer”, 2005-2007. Investigador principal: Fernando Valdivieso Amate
- Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación, Plan Nacional, Programa de Biomedicina “Posible implicación del HSV-1 en la enfermedad de Alzheimer”, 2008-2011, referencia SAF2007-62498. Investigador principal: Fernando Valdivieso Amate
- Proyecto de investigación solicitado por empresas, sobre “Obtención de nuevos YACs portadores de mutaciones en el locus APP humano asociadas a la enfermedad de Alzheimer y generación posterior de ratones transgénicos”, 2006-2008. Neuron BioPharma SA (Armilla, Granada, España). Investigador principal: Lluís Montoliu
- Diego Muñoz Santos: Beca FPI, MICINN, referencia BES-2008-003212, vinculada al proyecto SAF2007-62498. (Septiembre 2008-Agosto 2012)

Los siguientes documentos de patente, contrato y licencia de explotación están relacionados con los materiales descritos en la presente Tesis Doctoral:

- Patente “Modelo animal de enfermedad de Alzheimer, procedimiento de obtención y aplicaciones”, co-titularidad al 50% entre UAM y CSIC. OEPM referencia nº 200503002, con fecha 2 de diciembre de 2005. Inventores: Fernando Valdivieso, Lluís Montoliu, Julio Pozueta.
- Contrato de licencia exclusiva de explotación de la patente nº 200503002 y asistencia técnica entre la UAM y el CSIC y Neuron Biopharma, SA. Firmado en Madrid, el 27 de enero de 2006.
- Licencia de derechos de explotación del material (ratones transgénicos “modelo enfermedades neurodegenerativas”) entre el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Neuron, Biopharma, SA. Firmado en Madrid, el 13 de abril de 2012.

**A mis padres
y hermanos**

A Brenda, por haber estado a mi lado en este largo camino, haberme animado en los momentos difíciles y, sobre todo, haberme hecho llegar tanto cariño. Sin ti no hubiera sido posible... GRACIAS

Me gustaría agradecer en las próximas líneas a todas las personas que han estado a mi lado y han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis: a Fernando Valdivieso por haberme abierto las puertas de tu laboratorio y apostar por mí en este apasionante proyecto, por recibirme siempre con una sonrisa y por tu capacidad para solucionar todos los problemas que han ido surgiendo; y a Lluís Montoliu, por haberme hecho un hueco en tu laboratorio cuando más complicado se hacía el camino, por tu constancia y perseverancia, que han hecho posible la consecución de cada uno de los propósitos que nos habíamos planteado; por estar siempre abierto ante cualquier problema y por tu eficacia a la hora de resolver todas las dudas que se me planteaban. Los dos me habéis hecho crecer no sólo en lo profesional, sino también en lo personal. Muchas gracias.

Por empezar desde el principio, me gustaría dar las gracias a Javi, mi primer mentor, que apostó por mí desde que le conocí como profesor en unas prácticas (aunque preferías a Excelman). Gracias a ti pude conocer de primera mano todo lo que se “cocía” en un laboratorio y despertaste en mí un gran interés por este mundo. Todavía recuerdo la lisozima de clara de huevo y el tratado sobre enzimología que me hiciste escribir... Por esto y por mucho más te quiero dar las gracias, amigo.

Quiero agradecer a toda la gente del laboratorio de Fernando en el CBMSO por todo lo que me han enseñado. Guardaré muy buenos recuerdos de vosotros, además de amistad. A Isabel, por toda la ayuda con el ARN y estar siempre dispuesta a echar una mano; gracias también por las nueces “atróficas”; a MariaJe, por mostrarme tu interés y preocupación por todo el trabajo que he ido realizando y por enseñarme a hacer el “Study” con el programa SDS (que no es fácil); a Loreto, por tener siempre una sonrisa y estar dispuesta a ayudar en lo que hiciese falta; a Meri, por tu amabilidad y enseñarme a ser crítico conmigo mismo; a Jesús, por echarme una mano cuando había un problema y solucionarlo de la forma más pragmática posible, por tu buen humor y por traer unas nueces mejores que las de Isabel; a Junior, por las grandes tardes en las que tú me enseñabas a diseccionar ratones y yo a ti chistes (gracias también por aguantarlos), gracias por darme tu apoyo y consejos en los momentos más difíciles; a Soraya, por toda la ayuda con los *western*, por escucharme y entenderme; a Teresa porque siempre has estado dispuesta a echar una mano en lo que hiciera falta a pesar de ser el “primo exiliado”; a Jorge, por enseñarme el mundo de la PCR y por tu paciencia, que hay que tenerla para contestar a la cantidad de preguntas que me surgieron en los inicios; a Juanito, por tu sabiduría y humor, además de ser la primera persona de la que recibe una llamada cuando gana un título nuestro querido Real Madrid; a Carlitos, por tus sabias sugerencias y haberme hecho reír; y a todos los demás: Anita, MCR, Sandra, Susana, Esther; y las últimas incorporaciones: Heni, Bea y Manuel.

También me gustaría agradecer a la gente del laboratorio 111 en el CNB. A Almudena, porque la mitad de esta tesis es tuya; gracias por tus innumerables ayudas, tu apoyo constante, por tu actitud positiva y haberme apoyado en los peores momentos; a Marta, por haberse encargado del cuidado de todos mis ratones, si no es por ti, habrían podido conmigo; a Cristina, por sus ayudas, sobre todo en la recta final, por hacer de diana con mis “bolitas de papel de plata” y por enseñarme, al igual que Almudena, un poquito de andaluz (a partir de ahora sabré que un pero es una manzana); a Davide, gracias por tu ayuda con la cuantitativa, por tus bromas (*Grazie*, *Graziella*...) y porque me has hecho ver que muchas de las cosas que creíamos adoptadas de Italia, allí ni siquiera existen, como por ejemplo: los canelones, la salsa boloñesa, la napolitana y que el *peperoni* no es salami, sino pimiento; a Esther, por todo el tiempo que hemos compartido como “predocs”; a Edu, por su actitud receptiva y ayudas prestadas, y por fastidiarme los postres a la hora de la comida recordando la cantidad de grasas saturadas que llevan; y a los que ya no están: Almudena Tello y María Barandalla.

Gracias a Sole y a Óscar, del servicio de histología del CNB; Óscar, nunca imaginé que el microtomo sirviera para cortar fresas y se pudieran almacenar en el *tupper* de los Pinypon; a los de Criopreservación y Emma: a Julia, por su buen humor y acompañar con una cerveza siempre que hiciera falta; a María Jesús, por sus clases de veterinaria y explicar las 1001 formas de castrar animales; y a Marta Castrillo. Quiero agradecer también al servicio de compras, en especial a Montse, por su amabilidad y haber gestionado la cantidad de pedidos que he necesitado (sobre todo con los numeritos de Sigma).

Gracias a José Ramón y José del laboratorio 115 en el CNB, por enseñarme los tests de comportamiento animal.

Para la generación de los ratones ha sido necesaria la ayuda y habilidad de Sagrario Ortega y sus miembros del laboratorio del CNIO, así como Alfredo Serrano, Belén Pintado y Marta García, del servicio de transgénesis del CNB-CBMSO-CSIC. Muchas gracias por vuestro esfuerzo y haber sido capaces de generar estos ratones.

Gracias a Alasdair MacKenzie, por lo que aprendí en mi estancia en Escocia, tanto de trabajo como de cultura del país; hiciste que mi estancia en Aberdeen fuera más agradable y que catase las aproximadamente 500 variedades de whisky del Grill. También quiero agradecer al resto de gente de Aberdeen: A Scott, Ben y Lynne.

Es turno de dar las gracias a todos mis amigos, que han hecho que lo pasara bien y desconectara de la tesis: a Dani, Javi y Maverick; a Miguel y Laura; a Gonzalo y Cristina; a Reyes y Vartan; a Belén y David; a Joseste y Cristina y al pequeño Mario.

Quiero agradecer también a toda mi familia: a mis padres, por haberme dado todo lo que he necesitado a lo largo de mi vida, sin vuestro cariño y apoyo no habría llegado nunca hasta aquí; y a mis hermanos José e Inés, por su apoyo constante, por cuidar de mí y por hacerme reír a menudo. A mi cuñado Rodolfo por enseñarme a pescar peces más grandes que los que pesca él y por las risas que nos echamos hablando del curro y de los críos; y a mi cuñada Rebeca, por recordarme los días que me faltaban para entregar la tesis y contar gracietas y chistes tan malos como los míos por solidaridad. Me gustaría agradecer también a las dos pequeñas que se han incorporado a la familia: a mis sobrinas Sara y Cris, por despertarme una sonrisa siempre y hacer que esta última parte de la tesis resultara menos dura.

A mi novia Brenda, porque sin ti nada hubiese sido posible. Has luchado todo lo que has podido y más para que todo fuera más fácil. He sentido tu cariño y apoyo en todo momento y jamás voy a olvidar lo que has hecho por mí.

Por último me gustaría agradecer a mi otra familia: a Mila, Nano, Chelo y Fernando porque he sentido vuestras alegrías en los buenos momentos y habéis sabido apoyarme cuando algo iba peor; a mi “cuñá” Leti, por aguantarme este verano y haberme ayudado en todo lo que hiciese falta (menos en hacer la comida); a Mario, por los buenos momentos que hemos pasado juntos; a Neli y Richard, porque os habéis preocupado por mí y me habéis hecho sentir como uno más de la familia; a Samuel, Pablo y Marcos por todo lo que han jugado conmigo y por haber despertado al “niño que llevo dentro”.

¡Gracias a todos!

ABREVIATURAS

5-FOA	Ácido 5-fluoroorótico
A β	Péptido β -amiloide
A β 40	Péptido β -amiloide (1-40)
A β 42	Péptido β -amiloide (1-42)
AcLi	Acetato de Litio
ADAM	Metaloproteasa de la Familia de las Desintegrinas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
AICD	Dominio Intracelular de la proteína APP
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
amp ^R	Gen de resistencia a ampicilina
APOE	Apolipoproteína E
APOE- ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4	Isoformas E2, E3 y E4 de la Apolipoproteína E
APOE	Gen de la Apolipoproteína E
APOE- ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4	Alelos 2, 3 y 4 del gen de la Apolipoproteína E
APP	Gen de la proteína precursora del péptido β -amiloide
APP	Proteína precursora del péptido β -amiloide
App	Gen de la proteína precursora del péptido β -amiloide de ratón
App	Proteína precursora del péptido β -amiloide de ratón
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosómico
BACE 1	Proteasa que corta en el sitio β de la Proteína APP o β -secretasa 1
BACE 2	Proteasa que corta en el sitio β de la Proteína APP o β -secretasa 2
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CBMSO	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CNB	Centro Nacional de Biotecnología
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
Cyh	Cicloheximida
C-terminal	Extremo Carboxilo Terminal
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dCTP [α - ³² P]	Desoxicitosina trifosfato marcada en posición α con fósforo 32
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMEM	Medio Esencial Mínimo modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNasa	Dexosinucleasa
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Enfermedad de Alzheimer esporádica
EAf	Enfermedad de Alzheimer familiar

EDTA	Ácido Etilen-Diamino-Tetracético
ES	Células Embrionarias Pluripotentes
F0	Ratón transgénico fundador
F1	Primera generación filial de ratones transgénicos
F2	Segunda generación filial de ratones transgénicos
FCS	Suero fetal bovino
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KPI	Dominio Inhibidor de Serínproteasas de la Familia de Kunitz
L-APP	APP derivado de leucocitos
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia
Mb	Megabase
MEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle
<i>neo</i>	Gen de resistencia a neomicina
N-terminal	Extremo Amino Terminal
pb	Par de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción de amplificación en cadena de la ADN polimerasa
PEG	Polietilén glicol
PEV	Variegación por efecto de posición (del inglés, <i>Position Effect Variegation</i>)
PFGE	Electroforesis de gel en campo pulsado
PrP	Proteína priónica
<i>PS1/PS2</i>	Gen de la Presenilina 1/Presenilina 2
<i>PS1/PS2</i>	Proteína Presenilina 1/ Presenilina 2
qPCR	PCR cuantitativa
RNasa A	Ribonucleasa de tipo A
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa seguida de PCR
sAPP	APP soluble
sAPP α / sAPP β	APP soluble α / β
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SNC	Sistema Nervioso Central
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-Acetato EDTA
TBE	Tris-Borato EDTA
TE	Tris EDTA
Tg	Transgénico
UV	Ultravioleta
U	Unidades
<i>wt</i>	Silvestre (del inglés, <i>wild type</i>)
YAC	Cromosoma artificial de levadura

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	XXV
SUMMARY	XXVII
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	3
1.1.2 ALTERACIONES NEUROPATOLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
1.1.2.1 Muerte neuronal	4
1.1.2.2 Ovillos neurofibrilares	5
1.1.2.3 Placas seniles	5
1.1.3 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR Y ESPORÁDICA	6
1.1.3.1 Factores de riesgo genéticos asociados a la enfermedad de Alzheimer	7
1.1.3.2 Factores de riesgo ambientales asociados a la enfermedad de Alzheimer	8
1.1.4 ORIGEN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	10
1.2 APP	10
1.2.1 EL GEN <i>APP</i>	10
1.2.1.1 Expresión del gen <i>APP</i>	11
1.2.2 LA PROTEÍNA APP	11
1.2.2.1 Procesamiento proteolítico de la proteína APP y generación del péptido A β	14
1.2.3 MUTACIONES EN EL GEN <i>APP</i> : LA MUTACIÓN “SUECA”	15
1.3 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA EA	17
1.3.1 RATÓN APP YAC	18
1.3.1.1 Cromosomas artificiales de levadura (YAC)	18
1.3.1.2 Generación del ratón transgénico con un YAC de APP	19
1.3.1.3 Factor de transcripción GABPA (E4TF1-60)	20

1.3.2 RATÓN PDAPP	20
1.3.3 RATÓN Tg2576	21
1.3.4 RATÓN TgAPP23	22
1.3.5 RATONES TgJ9 y TgJ20	23
1.3.6 RATÓN TgCRND8	23
1.3.7 RATONES “APP Dutch”, ARC6 y ARC48	23
1.3.8 RATONES DOBLES TRANSGÉNICOS	24
1.3.9 RATONES TRIPLES TRANSGÉNICOS	25
1.3.10 VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS MODELOS EN EL ESTUDIO DE LA EA	27
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 VECTORES DE CLONAJE	37
3.1.1 PLÁSMIDOS UTILIZADOS	37
3.1.1.1 pRV1	37
3.1.1.2 pYAC4	37
3.1.1.3 YDp-L	37
3.1.1.4 pRS306	38
3.1.2 GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS	38
3.1.2.1 Herramientas bioinformáticas	38
3.1.2.2 Clonajes generales	39
3.1.2.3 Electroforesis de ADN	39
3.1.2.4 Reacción de amplificación en cadena de la ADN Polimerasa (PCR)	39
3.1.2.5 Extracción y purificación de ADN de geles de agarosa	40
3.1.2.6 Cuantificación de ADN	40
3.1.2.7 Cepas bacterianas y medios de cultivo	40
3.1.2.8 Preparación y transformación de bacterias competentes	41

3.1.2.9 Purificación de ADN plasmídico	41
3.1.2.10 Secuenciación de ADN	42
3.1.2.11 Mutagénesis dirigida	42
3.2 CEBADORES	42
3.2.1 YAC	42
3.2.1.1 Brazos del YAC	42
3.2.1.2 Región 5'	43
3.2.1.3 Gen <i>APP</i> humano	43
3.2.1.4 Región 3'	45
3.2.1.5 Sondas	45
3.2.2 SEXO Y PLOIDÍA DE LEVADURAS	46
3.2.3 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	46
3.2.4 PCR CUANTITATIVA (qPCR)	46
3.2.5 ANÁLISIS ISOFORMAS APP	46
3.3 MODIFICACIONES DE YACs	47
3.3.1 CEPAS DE LEVADURA Y MEDIOS DE CULTIVO	47
3.3.2 TRANSFERENCIA DE YACs EN LEVADURAS	48
3.3.3 RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN LEVADURAS	49
3.3.3.1 Recombinación homóloga mediante integración y fragmentación cromosómica. Preparación y transformación de levaduras competentes	49
3.3.3.2 Recombinación homóloga mediante el método <i>Pop-in/Pop-out</i>	50
3.3.4 ANÁLISIS DE CLONES RECOMBINANTES DE LEVADURA	50
3.3.4.1 Extracción de ADN genómico de levaduras	50
3.3.4.2 PCR	51
3.3.4.2.1 PCR de colonias de levadura	51
3.3.4.2.2 PCR de ADN genómico de levadura	52
3.3.4.3 Análisis mediante hibridación ADN-ADN (<i>Southern blot</i>)	52

3.3.4.4 Preparación de bloques de agarosa con células de levadura a pequeña escala	52
3.3.4.5 Electroforesis de gel en campo pulsado (PFGE)	53
3.4 PREPARACIÓN DE YACs PARA MICROINYECCIÓN Y TRANSFECCIÓN	54
3.4.1 PREPARACIÓN DE BLOQUES DE AGAROSA CON CÉLULAS DE LEVADURA A GRAN ESCALA	54
3.4.2 PURIFICACIÓN DE YACs MEDIANTE PFGE	55
3.5 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS	57
3.5.1 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS MEDIANTE MICROINYECCIÓN	57
3.5.2 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES DE RATÓN Y POSTERIOR GENERACIÓN DE RATONES QUIMÉRICOS	58
3.5.2.1 Línea celular ES y medio de cultivo	58
3.5.2.2 Transfección de células ES de ratón con ADN del YAC	58
3.5.2.3 Análisis de clones de células ES	59
3.5.2.3.1 Extracción de ADN genómico de células ES	59
3.5.2.3.2 PCR de ADN genómico de células ES	60
3.5.2.3.3 <i>Southern blot</i> de ADN genómico de células ES	60
3.5.2.4 Generación de ratones quiméricos	60
3.5.3 IDENTIFICACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS	61
3.5.3.1 Extracción de ADN genómico de ratón	61
3.5.3.2 PCR de ADN genómico de ratón	61
3.5.3.3 <i>Southern blot</i> de ADN genómico de ratón	61
3.5.4 TRANSMISIÓN A LA LÍNEA GERMINAL	62
3.5.5 MANTENIMIENTO DE COLONIAS	62
3.6 ANÁLISIS DE RATONES TRANSGÉNICOS	62
3.6.1 CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL YAC	62
3.6.1.1 qPCR de ADN genómico	62
3.6.1.2 <i>Slot blot</i>	63

3.6.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>APP</i> HUMANO	64
3.6.2.1 Perfusión y disección de ratones para extracción de ARN y proteínas	64
3.6.2.2 Extracción de ARN total	65
3.6.2.3 Cuantificación de ARN mensajero (ARNm) por PCR con transcriptasa reversa cuantitativa (RT-PCR cuantitativa)	65
3.6.2.4 Extracción y cuantificación de proteínas totales	66
3.6.2.5 Inmunomarcado después de electrotransferencia proteica (<i>western blot</i>)	67
3.6.2.5.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (<i>SDS-PAGE</i>)	67
3.6.2.5.2 Electrotransferencia proteica	67
3.6.2.5.3 Inmunodetección y revelado	67
3.6.2.5.4 Anticuerpos	68
4. RESULTADOS	73
4.1 EL YAC APP-8 (CLON B142F9)	73
4.1.1 ANÁLISIS DEL GEN <i>APP</i> HUMANO Y SUS REGIONES COLINDANTES	73
4.1.2 DELIMITACIÓN DEL YAC APP-8	74
4.1.2.1 Delimitación de la región 5'	74
4.1.2.2 Delimitación de la región 3'	74
4.1.3 TAMAÑO DEL YAC	75
4.2 MODIFICACIONES DEL YAC	76
4.2.1 TRANSFERENCIA DEL YAC A LA CEPA <i>WINDOW YLBW4</i>	76
4.2.1.1 Análisis de los clones resultantes de la transferencia mediante PCR	77
4.2.1.2 Análisis de los clones B142F9W4 mediante PFGE y <i>Southern blot</i>	79
4.2.2 PRIMERA RECOMBINACIÓN: INTRODUCCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A NEOMICINA EN EL BRAZO URA	82
4.2.2.1 Análisis de los clones resultantes de la primera recombinación homóloga mediante PCR	83
4.2.2.2 Análisis de los clones APPneoW4 mediante PFGE y <i>Southern blot</i>	85

4.2.3 SEGUNDA RECOMBINACIÓN: ELIMINACIÓN DEL GEN <i>GABPA</i>	87
4.2.3.1 Estudio de las regiones repetitivas y elección de secuencias de homología	87
4.2.3.2 Generación del vector de recombinación pYAC4'-SecA-Leu	88
4.2.3.3 Recombinación homóloga en el YAC APPneo	89
4.2.3.4 Análisis de los clones seleccionados en la segunda recombinación homóloga mediante PCR	91
4.2.3.5 Análisis de los 5 clones positivos mediante PFGE y <i>Southern blot</i>	93
4.2.3.5.1 Determinación de la fragmentación del YAC mediante PFGE	93
4.2.3.5.2 Análisis de la región codificante por <i>Southern blot</i>	94
4.2.3.5.3 Análisis de la región de recombinación mediante <i>Southern blot</i>	95
4.2.4 TERCERA Y CUARTA RECOMBINACIÓN (<i>POP-IN/POP-OUT</i>): INTRODUCCIÓN DE LA MUTACIÓN “SUECA”	97
4.2.4.1 Estudio de las regiones repetitivas y elección de la secuencia de homología	97
4.2.4.2 Generación del vector de recombinación pRS306-APP16swe	98
4.2.4.3 Recombinación homóloga en el YAC APPwt (Generación de <i>Pop-in</i>)	101
4.2.4.3.1 Análisis de los clones <i>Pop-in</i> mediante PCR, PFGE y <i>Southern blot</i>	101
4.2.4.4 Recombinación homóloga en el YAC APP-POP/IN (Generación de <i>Pop-out</i>)	107
4.2.4.4.1 Análisis de los clones <i>Pop-out</i> mediante PCR, PFGE y <i>Southern Blot</i>	107
4.3 PURIFICACIONES DE YACs	114
4.4 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS	115
4.4.1 GENERACIÓN DEL RATÓN APPwt	115
4.4.1.1 Microinyección del YAC APPwt en el pronúcleo de oocitos fecundados	115
4.4.1.1.1 Identificación y análisis de ratones transgénicos fundadores APPwt	116
4.4.1.1.2 Transmisión del transgén YAC APPwt a la descendencia (F1)	118
4.4.1.1.3 Análisis de la expresión del gen <i>APP</i> humano en las líneas Tg2670 y Tg2673	121
4.4.1.1.4 Nomenclatura oficial de los ratones transgénicos Tg2670 y Tg2673	124

4.4.1.2 Transfección de células embrionarias pluripotentes de ratón y posterior generación de ratones quiméricos	125
4.4.1.2.1 Identificación de células ES portadoras del YAC APPwt	126
4.4.1.2.2 Análisis de la expresión del gen <i>APP</i> humano en células ES	126
4.4.1.2.3 Generación de ratones quiméricos a partir del clon 25 de células ES	128
4.4.1.2.4 Identificación de ratones quiméricos APPwt	129
4.4.1.2.5 Transmisión del YAC APPwt a la línea germinal en ratones quiméricos	130
4.4.1.2.6 Análisis de la expresión del gen <i>APP</i> humano en la línea Tg25	131
4.4.1.2.7 Nomenclatura oficial del ratón transgénico Tg25	137
4.4.2 GENERACIÓN DEL RATÓN APPswe	138
4.4.2.1 Microinyección del YAC APPswe en el pronúcleo de oocitos fecundados	138
4.4.2.1.1 Identificación y análisis de ratones transgénicos fundadores APPswe	138
4.4.2.1.2 Transmisión del transgén YAC APPswe a la descendencia (F1)	141
4.4.2.1.3 Análisis de la expresión del gen <i>APP</i> humano en las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860	142
4.4.2.1.4 Nomenclatura oficial de los ratones transgénicos Tg3755, Tg3763 y Tg3860	148
4.4.3 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS	149
4.4.3.1 qPCR	149
4.4.3.2 <i>Slot blot</i>	150
5. DISCUSIÓN	155
5.1 OBTENCIÓN DEL YAC APPwt, PORTADOR DEL LOCUS DEL GEN <i>APP</i> SILVESTRE	155
5.2 OBTENCIÓN DEL YAC APPswe, PORTADOR DEL LOCUS DEL GEN <i>APP</i> CON LA MUTACIÓN “SUECA”	161
5.3 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS MEDIANTE MICROINYECCIÓN Y TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS ES	164

5.4 EXPRESIÓN DEL GEN APP HUMANO EN LOS RATONES TRANSGÉNICOS Y CÉLULAS ES	169
5.5 VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS MODELOS GENERADOS	175
6. CONCLUSIONES	183
7. BIBLIOGRAFÍA	189
ANEXOS	219
ANEXO 1	219
ANEXO 2	221
ANEXO 3	223
PUBLICACIÓN	225

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla I.1. Mutaciones en el gen <i>APP</i>	17
Tabla I.2. Resumen de los modelos transgénicos de ratón más utilizados para el estudio de la EA	26
Tabla MM.1. Cebadores utilizados para la detección de secuencias propias de los brazos en los diferentes YACs	42
Tabla MM.2. Cebadores utilizados para la delimitación y análisis de los diferentes YAC en la región 5' que flanquea el gen <i>APP</i>	43
Tabla MM.3. Cebadores utilizados para el análisis del promotor y diferentes exones del gen <i>APP</i>	44
Tabla MM.4. Cebadores utilizados para la delimitación y análisis de los diferentes YAC en la región 3' que flanquea el gen <i>APP</i>	45
Tabla R.1. Datos de las diferentes sesiones de microinyección del YAC <i>APPwt</i>	115 y 219
Tabla R.2. PCR de los 5 ratones transgénicos <i>APPwt</i>	118
Tabla R.3. Transmisión a la F1 del YAC <i>APPwt</i> en las líneas Tg2670 y Tg2673	119
Tabla R.4. Datos de las diferentes sesiones de inyección de las células ES 25 y generación de ratones quiméricos	128 y 221
Tabla R.5. Datos de las diferentes sesiones de microinyección del YAC <i>APPswe</i>	138 y 223
Tabla R.6. PCR de los 10 ratones transgénicos <i>APPswe</i>	139
Tabla R.7. Transmisión a la F1 del YAC <i>APPswe</i> en las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860	141
Tabla R.8. Resumen de las diferentes líneas transgénicas generadas	151

Figuras

Figura I.1. Muerte neuronal	4
Figura I.2. Marcas histopatológicas características de la enfermedad de Alzheimer	6
Figura I.3. Distribución de la enfermedad de Alzheimer según la variante familiar (EAF) o esporádica (EAE)	9
Figura I.4. Transcritos de <i>APP</i> generados por <i>splicing</i> alternativo	13
Figura I.5. Esquema del procesamiento proteolítico de la proteína <i>APP</i>	15
Figura I.6. Mutaciones en la proteína <i>APP</i>	16

Figura MM.1. Esquema de la disección del encéfalo de ratón	65
Figura R.1. Diagrama del locus del gen <i>APP</i> humano (<i>Ensembl</i>).....	73
Figura R.2. Delimitación y tamaño del YAC APP (esquema).....	75
Figura R.3. Elección de la cepa YLBW4 para la transferencia del YAC APP-8 (clon B142F9) desde la cepa AB1380	77
Figura R.4. Análisis por PCR de colonias obtenidas en el proceso de transferencia del YAC	78
Figura R.5. Análisis por <i>Southern blot</i> comparativo del clon B142F9 y clones B142F9W4	80
Figura R.6. Separación de cromosomas de levaduras mediante PFGE y posterior <i>Southern blot</i>	81
Figura R.7. Esquema de integración por recombinación homóloga de pRV1 lineal en el brazo Ura del YAC APP-8.....	83
Figura R.8. Análisis por PCR de colonias obtenidas en la primera recombinación homóloga.....	84
Figura R.9. Análisis por <i>Southern blot</i> comparativo del clon B142F9 y clones APPneoW4	85
Figura R.10. Separación de cromosomas de levaduras tras la primera recombinación mediante PFGE y posterior <i>Southern blot</i>	86
Figura R.11. Matrices de homología de secuencia de la SecA, SecB y el YAC APP-8 (<i>MacVector</i>).....	88
Figura R.12. Esquema de la generación del plásmido de recombinación pYAC4'-SecA-Leu y su posterior linealización.....	90
Figura R.13. Esquema previsto para la fragmentación del YAC APPneo mediante recombinación homóloga.....	91
Figura R.14. Análisis por PCR de colonias seleccionadas en la segunda recombinación homóloga.....	92
Figura R.15. Análisis por PCR de colonias positivas de la segunda recombinación homóloga.....	93
Figura R.16. Separación de cromosomas de levaduras mediante PFGE y posterior <i>Southern blot</i>	94
Figura R.17. Análisis por <i>Southern blot</i> comparativo del clon B142F9 y clones W4c11, 19, 26, 38 y 49	95
Figura R.18. Esquema teórico del análisis de la región de recombinación mediante <i>Southern blot</i>	96
Figura R.19. <i>Southern blot</i> de la región de recombinación.....	96
Figura R.20. Matriz de homología de secuencia de gAPP16 y el YAC APP-8 (<i>MacVector</i>).....	98
Figura R.21. Esquema de la generación del plásmido de recombinación pRS306-gAPP16swe y su posterior linealización.....	100
Figura R.22. Esquema del proceso de <i>Pop-In/Pop-Out</i>	102
Figura R.23. Análisis por PCR de colonias seleccionadas de la tercera recombinación homóloga (<i>POP-IN</i>).....	103

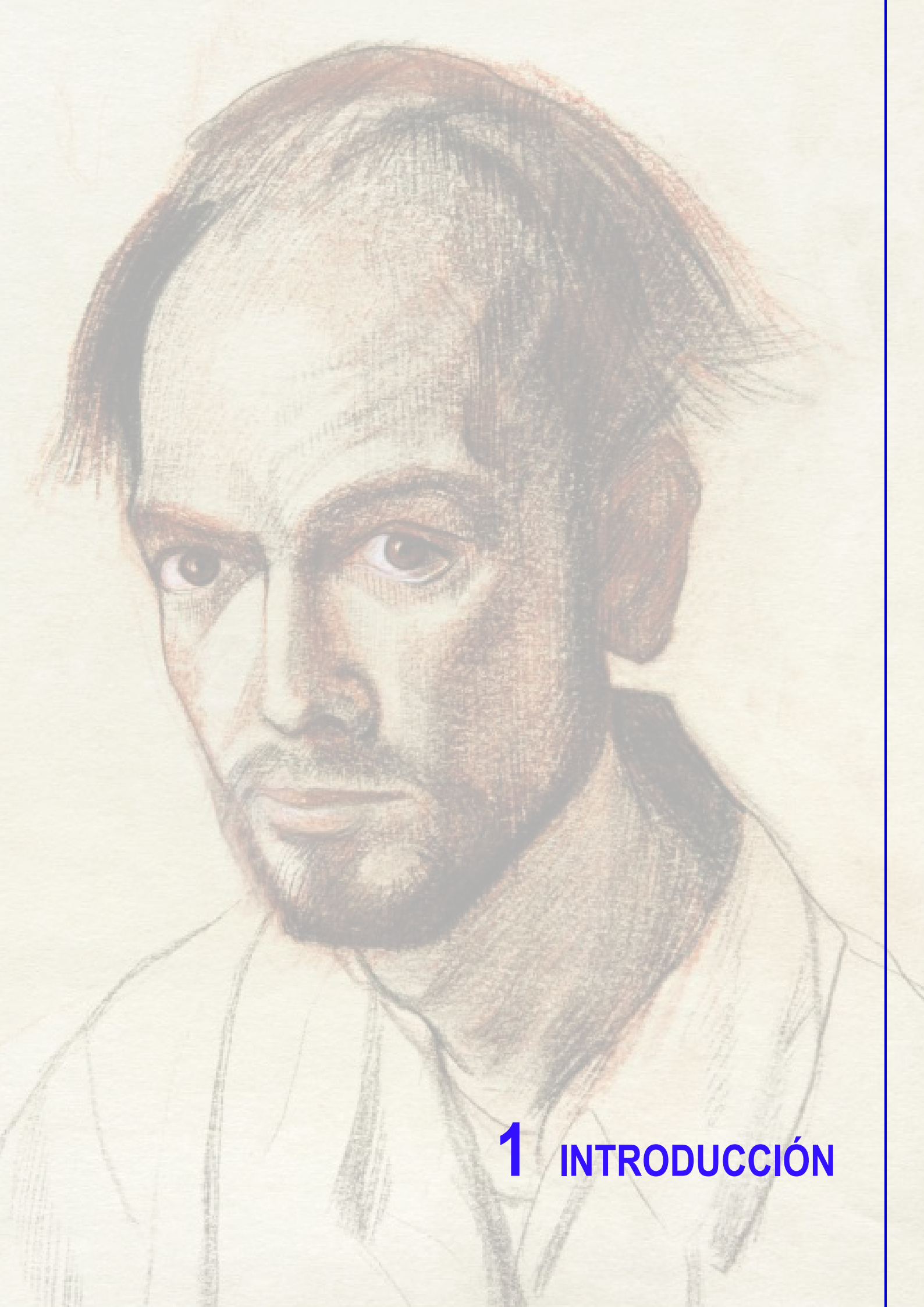
Figura R.24. Separación de cromosomas de levaduras mediante PFGE y posterior <i>Southern blot</i>	104
Figura R.25. Esquema teórico del análisis de la región de recombinación mediante <i>Southern blot</i>	105
Figura R.26. <i>Southern blot</i> de la región de recombinación.....	106
Figura R.27. Análisis por PCR de colonias obtenidas en la cuarta recombinación homóloga (POP-OUT).....	108
Figura R.28. Esquema teórico del análisis del producto de PCR del exón 16 del gen <i>APP</i> mediante restricción enzimática (<i>pDRAW32</i>).....	109
Figura R.29. Análisis del producto de PCR del exón 16 del gen <i>APP</i>	109
Figura R.30. Análisis por PCR de colonias positivas de la cuarta recombinación homóloga (POP-OUT).....	110
Figura R.31. Separación de cromosomas de levaduras mediante PFGE y posterior <i>Southern blot</i>	111
Figura R.32. <i>Southern blot</i> de la región de recombinación.....	111
Figura R.33. Análisis por <i>Southern blot</i> comparativo de los clones W4c19PO que portan la mutación.....	112
Figura R.34. Modificaciones de los diferentes YACs durante el estudio (Resumen).....	113
Figura R.35. Purificación de ADN del YAC.....	114
Figura R.36. Microinyección de ADN del YAC <i>APPwt</i> en el pronúcleo de oocitos fecundados para la obtención de ratones transgénicos.....	115
Figura R.37. Identificación mediante PCR de ratones transgénicos <i>APPwt</i>	116
Figura R.38. Análisis mediante PCR de los 5 ratones transgénicos <i>APPwt</i>	117
Figura R.39. Análisis mediante PCR de la transmisión a la línea germinal del YAC <i>APPwt</i> en el Tg2670.....	119
Figura R.40. <i>Southern blot</i> comparativo del clon W4c19 y los ratones transgénicos F0 y F1 mediante el uso de elementos Alu humanos (<i>FingerPrint</i>).....	121
Figura R.41. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de <i>APP</i> humano (rojo) y <i>App</i> murino (verde) en cerebros de ratones transgénicos (Tg2670 y Tg2673).....	122
Figura R.42. Detección de proteína <i>APP</i> humana mediante <i>western blot</i> en cerebros de ratones transgénicos (Tg2670 y Tg2673).....	124
Figura R.43. Identificación mediante PCR de células ES portadoras del YAC <i>APPwt</i>	126
Figura R.44. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de <i>APP</i> humano (rojo) y <i>App</i> murino (verde) en células ES.....	127
Figura R.45. Detección de proteína <i>APP</i> humana mediante <i>western blot</i> en células ES.....	127

Figura R.46. Ratones quiméricos obtenidos a partir del clon de células ES 25, portador del YAC APPwt	129
Figura R.47. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de <i>APP</i> humano (rojo) y <i>App</i> murino (verde) en cerebros de ratones transgénicos (Tg25).....	132
Figura R.48. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de <i>APP</i> humano (rojo) y <i>App</i> murino (verde) en el SNC (Tg25)	133
Figura R.49. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de <i>APP</i> humano (rojo) y <i>App</i> murino (verde) en diferentes órganos (Tg25).....	133
Figura R.50. Análisis de los tres transcritos principales del <i>APP</i> humano y del <i>App</i> murino en diferentes tejidos de ratones transgénicos de la línea Tg25	135
Figura R.51. Detección de proteína APP humana (anticuerpo 6E10) mediante <i>western blot</i> en cerebros de ratones transgénicos (Tg25).....	136
Figura R.52. Detección de los niveles de proteína APP humana y <i>App</i> murina (anticuerpo 22c11) mediante <i>western blot</i> en cerebros de ratones transgénicos (Tg25).....	137
Figura R.53. Identificación mediante PCR de ratones transgénicos APPswe	139
Figura R.54. Análisis del producto de PCR del exón 16 del gen <i>APP</i> de ratones APPswe.....	140
Figura R.55. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de <i>APP</i> humano con la mutación “sueca” (rojo) y <i>App</i> murino (verde) en cerebros de ratones transgénicos (Tg3755, Tg3763 y Tg3860).....	143
Figura R.56. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de <i>APP</i> humano (rojo) y <i>App</i> murino (verde) en el SNC (Tg3755 y Tg3860).....	144
Figura R.57. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de <i>APP</i> humano (rojo) y <i>App</i> murino (verde) en diferentes órganos (Tg25).....	145
Figura R.58. Detección de proteína APP humana (anticuerpo 6E10) mediante <i>western blot</i> en cerebros de ratones transgénicos (Tg3755, Tg3763 y Tg3860).....	146
Figura R.59. Detección de los niveles de proteína APP humana y <i>App</i> murina (anticuerpo 22c11) mediante <i>western blot</i> en cerebros de ratones transgénicos (Tg3755, Tg3763 y Tg3860).....	147
Figura R.60. Cuantificación, mediante qPCR de ADN genómico, del número de copias del YAC en cada línea transgénica	149
Figura R.61. Cuantificación, mediante <i>slot blot</i> , del número de copias del YAC en cada línea transgénica	150
Figura D.1. Estudio de regiones evolutivamente conservadas en la secuencia del YAC	159

RESUMEN / SUMMARY

Hasta la fecha se han generado multitud de modelos animales para el estudio de la enfermedad de Alzheimer (EA). Estos modelos han permitido conocer la relación existente entre determinados genes y la enfermedad, mediante la creación de animales transgénicos, incluso con la creación de dobles y triples transgénicos, portadores de mutaciones en los genes implicados. Sin embargo, estos modelos, mayoritariamente enfocados a la variante familiar (EAF) de la EA, presentan una serie de limitaciones que impiden usarlos como base experimental para la variante esporádica (EAE) de la EA, la causante de aproximadamente el 99% de casos de EA. El objetivo principal de esta Tesis Doctoral consiste en la generación de dos ratones transgénicos, como posibles nuevos modelos animales de EAE y EAF, capaces de expresar el gen *APP* humano correctamente, tanto en su variante silvestre (EAE) como en su variante mutada (EAF). Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha podido determinar la secuencia de ADN exacta que contiene el YAC APP-8, portador del locus *APP* humano, utilizado como material de partida. Se ha eliminado, de ese YAC APP-8, la secuencia del gen *GABPA* incluido dentro del YAC APP-8, generándose el YAC APPwt, con objeto de prevenir posibles interferencias en el fenotipo de los ratones transgénicos resultantes de la generación de animales transgénicos con este YAC, asociado a EAE. A partir del YAC APPwt, se obtuvo una variante mutante que contiene la mutación “Sueca” (K670N/M671L), asociada a EAF, utilizando el procedimiento *Pop-in/Pop-out* de recombinación homóloga en levaduras. Se han generado diversas líneas de ratones transgénicos con el YAC APPwt y con el YAC APPswe utilizando dos metodologías (microinyección en oocitos fecundados y lipofección de células ES con obtención posterior de fundadores a partir de los ratones quiméricos resultantes). El análisis de todas las líneas de ratones transgénicos generadas ha permitido determinar que existe expresión del transgén *APP* humano similar al locus *App* murino en una línea de APPwt y en dos líneas de APPswe. La distribución de isoformas *APP* humanas, derivadas del transgén APPwt y APPswe, sigue un patrón similar al conocido para el locus *APP* humano y distinto del locus *App* murino, lo cual indica que se ha conseguido restituir la expresión correcta del locus *APP* humano en estos ratones, sin la aparición de fenómenos de sobreexpresión artificial, documentada en modelos animales anteriores de EA, y en ausencia por vez primera del gen *GABPA*. Se ha confirmado la presencia de proteína APPwt y APPswe en las líneas de ratones transgénicos con la expresión correcta del transgén, en concentración similar a la proteína *App* endógena. Finalmente, en esta Tesis Doctoral, se han obtenido diversas líneas de ratones transgénicos APPwt y APPswe con una expresión normal del locus *APP* similar a la endógena, que era el objetivo principal que se perseguía.

To date, a large number of animal models have been generated to investigate the Alzheimer's Disease (AD). These models have allowed to uncover the existing relationship between specific genes and the disease, through the creation of transgenic animals, including the generation of double and triple transgenic individuals, carrying mutations in the associated loci. However, these animal models, mostly devised to study the familial variant (FAD) of AD, show a number of limitations preventing from using them as the experimental basis for the sporadic variant (SAD) of AD, which causes approximately the majority (99%) of AD reported cases. The main objective of this Doctoral Thesis consists in the generation of two transgenic mouse models, as potential new animal models for FAD and SAD, capable of correctly express the human *APP* gene, both for the sporadic (SAD) and the mutated-familial (FAD) variants of the locus. During the course of this Doctoral Thesis, it has been possible to determine the entire exact DNA sequence included within the YAC APP-8, harbouring the *APP* human locus, and used as the starting material for all subsequent experiments. From this YAC APP-8 clone, the coding DNA sequences corresponding to the *GABPA* gene, also included within the YAC APP-8 clone, have been eliminated. This deletion has been done to prevent from potential interferences in the expected phenotype of the resulting transgenic mice generated with this YAC, associated to SAD. From the resulting YAC APPwt, a mutant variant containing the Swedish mutation (K670N/M671L), associated to FAD, has been obtained using the Pop-in/Pop-Out homologous recombination method, available in yeast cells. Several transgenic mouse lines have been generated carrying the YAC APPwt and the YAC APPswe using two distinct methodologies, namely: microinjection of fertilized oocytes and lipofection of ES cells with the subsequent use of the positive ES clones for the generation of chimeric mice leading eventually to the establishment of founder transgenic mice. The analysis of all transgenic mouse lines generated has confirmed the normal expression of human *APP* YAC transgenes, similar to the endogenous *App* locus, for one mouse line carrying the APPwt transgene and for two lines carrying the APPswe transgene. The distribution of human *APP* isoforms, derived from transgenes APPwt and APPswe, follows a similar pattern comparable to the known behaviour of the human *APP* locus, and different from that of the murine *App* locus, strongly indicating that the correct expression of the human *APP* locus has been achieved, without involving the artificial overexpression of the transgenes reported in previous animal models of AD and in the absence of the *GABPA* gene for the first time. The presence of both APPwt and APPswe proteins has been confirmed in the transgenic mouse lines with correct transgene expression and with a concentration similar to that of the *App* endogenous protein. Finally, through this Doctoral Thesis, several transgenic mouse lines with APPwt and APPswe have been obtained, with a normal expression of the *APP* locus similar to the endogenous *App* gene, which was the initial goal of this Thesis.



1 INTRODUCCIÓN

1967. Autorretrato de William Utermohlen

Galería Beckel Odille Boïcos, París

William Utermohlen nació en Filadelfia en 1933. Se licenció en la Academia de Bellas Artes de Pensilvania en 1957. Se trasladó a Londres en 1962, donde trabajó la mayor parte de su vida profesional. En 1995 fue diagnosticado de la enfermedad de Alzheimer. Posteriormente, a medida que la enfermedad progresaba, la memoria de William se fue extraviando con las imágenes y presencias de toda una vida mientras frenéticamente plasmaba su propio rostro en el lienzo. Sus autorretratos muestran el desgaste indetenible de sus facultades y representan el testimonio más completo de la experiencia de un paciente con la enfermedad de Alzheimer.

<http://www.williamutermohlen.org/>

1.1 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

En 1907 el doctor Alois Alzheimer realizó un informe sobre el primer caso de la enfermedad de Alzheimer (EA) en una paciente, llamada Auguste D., que murió a los 56 años de edad, describiendo la enfermedad como un síndrome neuropatológico caracterizado por una demencia y un deterioro progresivo de las habilidades motoras (Alzheimer, 1907). Más de 100 años después, la EA es la principal causa de demencia, sumando más del 50% de todos los casos descritos (Querfurth & LaFerla, 2010). La demencia afecta, hoy en día, a más de 35 millones de personas en todo el mundo y se espera que la cifra incremente a lo largo de los años, estimando que para el año 2020 existirán más de 42 millones y en 2040 más de 81 millones de casos de demencia (Ballard et al., 2011). El proceso neurodegenerativo que se produce durante la EA tiene una evolución espacio-temporal característica: en la etapa inicial se afectan las regiones de la corteza temporal antes de extenderse al hipocampo, amígdala, tálamo anterior y otras regiones corticales (Whitehouse et al., 1982; Hyman et al., 1984; Arnold et al., 1991; Samuel et al., 1994; Horn et al., 1996; Morrison & Hof, 1997). En la etapa avanzada, la patología se extiende a la región cortical, concretamente a la frontal y temporal, y a las regiones límbicas, mientras que otras regiones, como el cerebelo, no se ven afectadas (Braak & Braak, 1991). En estas regiones afectadas se puede observar gliosis, pérdida masiva de neuronas, acompañada de la alteración de los procesos sinápticos (Blennow et al., 2006; Nussbaum & Ellis, 2003). Los síntomas clínicos más característicos son el deterioro progresivo e irreversible de la memoria, alteraciones en el comportamiento y la pérdida de la habilidad motora (apraxia), del lenguaje (afasia) y de la percepción de la realidad (agnosia) (McKhann et al., 1984).

La EA no se trata en sí de una enfermedad mortal, pero una vez diagnosticada la comorbilidad es mayor. Es decir, se aumentan las posibilidades de ciertos factores de riesgo que pueden causar la muerte. La muerte de los pacientes suele venir provocada por enfermedades infecciosas, o incluso, en fases tardías de la enfermedad, por desnutrición al fallar los instintos más básicos de supervivencia (Kukull et al., 1994).

1.1.2 ALTERACIONES NEUROPATOLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Tras la muerte de la primera paciente diagnosticada con la enfermedad, el doctor Alzheimer practicó la autopsia del cerebro. En el primer informe de 1907 relató que la autopsia revelaba “un cerebro completamente atrófico”, indicando que la muerte celular había reducido el tejido. También

señaló que las células nerviosas contenían “un haz enmarañado de fibrillas” y que existía “un almacenamiento de un producto metabólico patológico” alrededor de las células nerviosas. Hoy día se sabe que la primera lesión corresponde a los ovillos neurofibrilares y la segunda lesión a las placas seniles.

El diagnóstico actual de la enfermedad se basa en estudios neurológicos, en el análisis de imágenes cerebrales obtenidas por resonancia magnética de imagen (RMI), por tomografía de emisión de positrones (PET) o por tomografía computerizada de fotón único (SPECT), además de la identificación de biomarcadores en diferentes fluidos biológicos (Blennow & Zetterberg, 2009; Hampel et al., 2010; Ballard et al., 2011) y por la exclusión de otros tipos de demencia. Sin embargo, sólo se puede dar un diagnóstico definitivo de Alzheimer mediante el análisis anatomopatológico *post-mortem* del cerebro de los afectados (Blennow et al., 2006), por observación directa de los marcadores específicos del diagnóstico: las placas seniles y los ovillos neurofibrilares.

1.1.2.1 Muerte neuronal

La característica celular más importante de la EA es la elevada muerte neuronal. Ciertas regiones del cerebro pierden más del 80% de su contenido neuronal (Whitehouse et al., 1982) (**Figura I.1**). Estas pérdidas alteran la producción de neurotransmisores (Selkoe, 1991) como la acetilcolina, norepinefrina, serotonina, dopamina, glutamato, etc., así como los circuitos neuronales (Whitehouse et al., 1982; Hyman et al., 1984; Arnold et al., 1991) responsables de la memoria y el comportamiento del individuo.

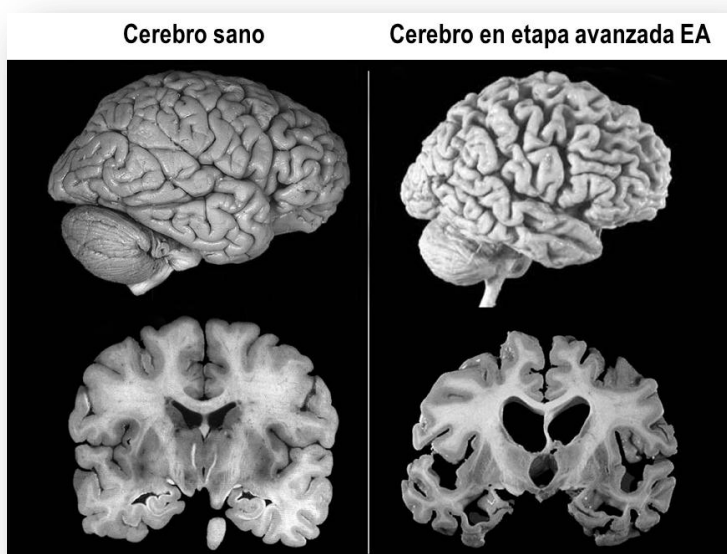


Figura I.1. Muerte neuronal. A la izquierda se puede apreciar el aspecto de un cerebro sano en una visión lateral (arriba) y en un corte coronal (abajo). A la derecha se puede apreciar un cerebro de una persona que padecía la EA en su etapa avanzada de la enfermedad. Se puede apreciar la disminución en el tamaño de éste debido a la muerte neuronal en comparación con el cerebro sano. Fotografía obtenida de “J.David Gladstone Institutes”.

1.1.2.2 Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares son estructuras que se localizan dentro de las neuronas distróficas de la corteza entorrinal, hipocampo, giro parahipocampal, amígdala y cortezas asociativas (Kidd, 1963; Terry, 1963) (**Figura I.2**). Están compuestos mayoritariamente por la proteína asociada a microtúbulos tau anormalmente hiperfosforilada (Baner et al., 1989; Lee et al., 1991; Wang et al., 1996) y agregada en filamentos helicoidales apareados (PHFs) (Miller et al., 1986; Wood et al., 1986; Wischik et al., 1988a; Wischik et al., 1988b). Asociados a estos filamentos, suele encontrarse la proteína MAP2 (Kosik et al., 1984), ubiquitina (Perry et al., 1987), neurofilamentos (Mulvihill & Perry, 1989), heparán sulfato proteoglicanos (Perry et al., 1991), componente amiloide del suero P (Kalaria & Grahovac, 1990), péptido β -amiloide (Perry et al., 1992), presenilina 1 (Busciglio et al., 1997) y APOE (Namba et al., 1991). Se ha descrito una correlación entre el número de estos ovillos con el grado de deterioro cognitivo durante el transcurso de la enfermedad (Gomez-Isla et al., 1996; Giannakopoulos et al., 2003).

1.1.2.3 Placas seniles

Las placas seniles son acúmulos de material extracelular intercalado con axones y dendritas generalmente hinchados o atroficos, siendo un tipo específico de amiloide compuesto por agregados fibrilares del péptido β -amiloide ($A\beta$) (Glennner & Wong, 1984; Masters & Beyreuther, 2006) (**Figura I.2**). Este péptido $A\beta$ se genera a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido β -amiloide (APP) y se identificó como un polipéptido de 40-43 aminoácidos cuyas funciones biológicas aún son desconocidas (Pearson & Peers, 2006; Small et al., 2001). En ciertas condiciones patológicas o de avanzada edad, el péptido $A\beta$ sufre un cambio conformacional que hace que se autoagregue, formando el estado oligomérico patológico, que ejecuta un conjunto de acciones citotóxicas responsables de la disfunción sináptica y del deterioro cognitivo sufridos durante la evolución de la neurodegeneración de la EA (Walsh et al., 2000; Walsh & Selkoe, 2007; LaFerla et al., 2007; Klyubin et al., 2008; Balducci et al., 2010a).

Además del péptido $A\beta$ se han identificado otros componentes en el núcleo de las placas, como la apolipoproteína E (Namba et al., 1991), presenilina 1 (Wisniewski et al., 1995; Busciglio et al., 1997), heparán sulfato proteoglicanos (Snow et al., 1988), clusterina/apolipoproteína J (McGeer et al., 1992), la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas (LRP) (Arelin et al., 2002), α -2 macroglobulina (Rebeck et al., 1995), tripsina (Smith et al., 1993), α -1 antiqumiotripsina (Abraham et al., 1988), ubiquitina (Perry et al., 1987), el componente del suero amiloide P (Kalaria & Grahovac, 1990), citoquinas (Griffin et al., 1989), proteínas del sistema del complemento (Eikelenboom & Stam,

1982) y altas concentraciones de cobre, hierro y zinc (Connor et al., 1992; Lovell et al., 1998; Lyubartseva & Lovell, 2012).

La placa senil se podría considerar la lesión más característica de la EA, aunque tanto su presencia como su densidad en los cerebros correlacionan muy débilmente con la edad de inicio o la severidad de la enfermedad (Davies et al., 1988; Roses, 1994; Davis et al., 1999). Sin embargo, existen estudios neuropatológicos de individuos de edad avanzada, que no padecían la enfermedad y presentaban niveles cognitivos normales, que demostraban la presencia de estas placas incluso en altas cantidades, sin que se vieran afectadas sus capacidades mentales (Crystal et al., 1988; Arriagada et al., 1992).

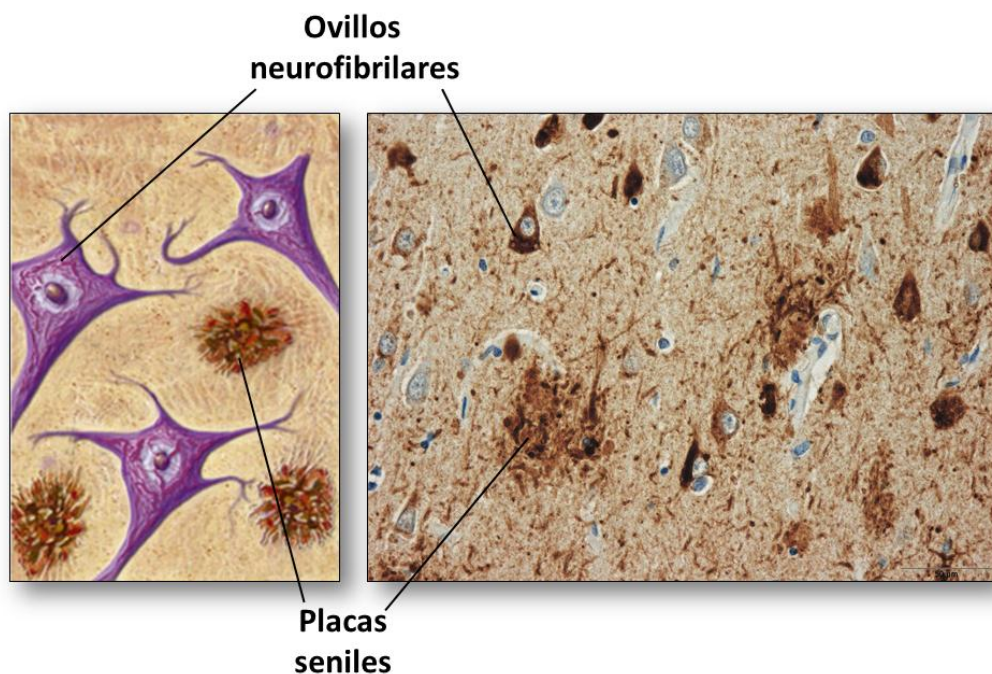


Figura 1.2. Marcas histopatológicas características de la enfermedad de Alzheimer. A la izquierda se observa un esquema a nivel celular de un cerebro afectado por la EA, en el que se puede apreciar que la acumulación de la proteína TAU hiperfosforilada sucede en el interior de las neuronas (en morado) y que las placas seniles son acumulaciones extracelulares, formadas por la agregación del péptido A β . A la derecha se puede apreciar una sección histológica de tejido cerebral de un individuo que padecía EA, correspondiente a la región del hipocampo, en el que se aprecian dichas estructuras. Imagen obtenida de "Washington University School of Medicine".

1.1.3 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR Y ESPORÁDICA

La etiología de la EA sigue siendo prácticamente desconocida (Blennow et al., 2006) a pesar de que la enfermedad se describió por primera vez hace más de 100 años. Sólo se conoce la causa de un porcentaje inferior al 1% de los casos de EA (**Figura 1.3**), los cuales se explican por mutaciones en los genes que codifican para la proteína APP (Goate et al., 1991; Mullan et al., 1992) y para la presenilina 1 (PS1) (Sherrington et al., 1995) y presenilina 2 (PS2) (Levy-Lahad et al., 1995),

descubiertas en familias en las que se había observado una muy alta predominancia de la enfermedad. Estas mutaciones eran las responsables del desarrollo de la enfermedad y se pudo comprobar que presentaban un patrón de herencia autosómico dominante, con casi un 100% de penetrancia y una aparición temprana de los síntomas, generalmente antes de los 65 años de edad (Blennow et al., 2006). Todas estas mutaciones incrementan la producción del péptido A β de 42 aminoácidos (Scheuner et al., 1996) y se ha constatado que las mutaciones de estos genes son las responsables sólo de un pequeño número de enfermos pertenecientes a la denominada enfermedad de Alzheimer familiar (EAF).

La forma más común de la enfermedad, que explicaría más del 99% restante de los casos (**Figura I.3**), es la denominada enfermedad de Alzheimer esporádica (EAE). Es de aparición tardía, por lo general se da en personas mayores de 65 años, y es de origen multifactorial (Blennow et al., 2006), ya que el desarrollo de la enfermedad se debe a una compleja interacción entre factores de susceptibilidad genéticos y ambientales (Blennow et al., 2006; Nussbaum & Ellis, 2003). Estudios realizados en gemelos monocigóticos y dicigóticos permitieron comprobar que la correlación en el desarrollo de la enfermedad entre los primeros era entre el 40-50% de los casos, y para gemelos dicigóticos bajaba al 10-50% (Pericak-Vance & Haines, 1995). El hecho de que prácticamente la mitad de gemelos monocigóticos no desarrollara la enfermedad cuando su hermano lo hacía, demostró la influencia de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad, ya que si la enfermedad tuviese una base puramente genética la correlación en el desarrollo de la enfermedad entre gemelos sería del 100% debido a que comparten la totalidad del genoma. De esta forma quedó establecida la doble influencia genética y de factores ambientales en esta enfermedad.

1.1.3.1 Factores de riesgo genéticos asociados a la enfermedad de Alzheimer

El principal factor de riesgo genético asociado a la EAE es el alelo $\epsilon 4$ del gen que codifica para la apolipoproteína E (*APOE- $\epsilon 4$*) (Corder et al., 1993; Poirier et al., 1993; Strittmatter et al., 1993; Lambert et al., 2009), aunque la posesión de este alelo no es necesaria ni suficiente para el desarrollo de la enfermedad (Farrer et al., 1997).

La apolipoproteína E (APOE) es una apolipoproteína implicada en el transporte de lípidos y de colesterol entre diferentes tejidos y células del organismo (Mahley & Rall, 2000). En el sistema nervioso central (SNC), APOE regula los niveles de colesterol en las membranas y participa en los procesos de reparación tras situaciones de daño neuronal (Ignatius et al., 1986; Mahley & Rall, 2000). El gen *APOE* posee tres variantes alélicas mayoritarias en humanos: *APOE- $\epsilon 2$* , $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ que dan lugar a las diferentes isoformas de la proteína denominadas *APOE- $\epsilon 2$* , $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ (Strittmatter & Roses, 1995).

La incidencia es dependiente de la dosis alélica, la posesión de un alelo *APOE-ε4* incrementa el riesgo de padecer la enfermedad tres veces y la posesión de dos alelos, hasta ocho veces (Corder et al., 1993). Además, *APOE-ε4* disminuye la edad de aparición de los síntomas de una forma dependiente de dosis (con cada copia se reduce la edad de comienzo aproximadamente en diez años) (Corder et al., 1993), aunque el modo en el que contribuye al desarrollo de la enfermedad está aún por determinar (Mahley et al., 2006).

Adicionalmente, en relación al gen *APOE*, se ha comprobado que un polimorfismo en la región promotora de dicho gen también incrementa el riesgo de padecer la EA (Artiga et al., 1998; Bullido et al., 1998), que ratones humanizados para *APOE-ε4* presentan daños cognitivos dependientes del género y de la edad (Raber et al., 1998), además, diferentes trabajos han demostrado que *APOE-ε4* es menos efectivo en los procesos de mantenimiento y reparación neuronales que la isoforma *ε3*, por lo que ante procesos neurodegenerativos asociados al envejecimiento o al estrés, la posesión de *APOE-ε4* contribuye a la patología asociada (Mahley & Huang, 1999); también se ha descrito que *APOE-ε4* induce la producción y la acumulación del péptido Aβ y la hiperfosforilación anómala de la proteína del citoesqueleto TAU (Tesseur et al., 2000; Ye et al., 2005).

Además de *APOE*, se han encontrado evidencias en la relación de otros genes con la EAE, tales como los que codifican para la proteína α-2 macroglobulina (Blacker et al., 1998), el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Okuizumi et al., 1995), la proteína TAU (Bullido et al., 2000), la butilcolinesterasa K (Lehmann et al., 1997), la catepsina D (Papassotiropoulos et al., 2000), la interleucina 1A y 1B (Nicoll et al., 2000); y de otros genes, relacionados mediante estudios de asociación, llegando a identificarse hasta más de treinta factores genéticos de predisposición (Bertram & Tanzi, 2004) (**Figura I.3**).

1.1.3.2 Factores de riesgo ambientales asociados a la enfermedad de Alzheimer

Los factores de riesgo genéticos descritos en el punto anterior no son capaces de explicar todos los casos de la EAE y ni siquiera está clara la relación que puede haber entre todos ellos. Se ha demostrado que, en ciertas ocasiones, para el desarrollo de la enfermedad es necesaria la combinación con ciertos factores epigenéticos y ambientales. El factor de riesgo ambiental más importante, y que se ha demostrado que su implicación sí es directa en el desarrollo de la variante esporádica de la enfermedad, es la edad avanzada (Lindsay et al., 2002; Munoz & Feldman, 2000). Pero existen otra serie de factores que también se han visto ligados a la EAE como son: el sexo femenino (Andersen et al., 1999; Farrer et al., 1997), el traumatismo craneoencefálico severo con

pérdida de conocimiento (Graves et al., 1990; Molgaard et al., 1990; Jellinger, 2004), la neuroinflamación (Holmes et al., 2009; McGeer & McGeer, 2001) y las infecciones, en particular las producidas por el virus Herpes Simplex de tipo 1 (HSV-1) (Itzhaki et al., 1997; Latchman, 1997a; Burgos et al., 2002; Dobson et al., 2003; Honjo et al., 2009; Santana et al., 2012; Alvarez et al., 2012) (**Figura I.3**). Todos los factores ambientales descritos se han visto relacionados con un aumento en la predisposición para padecer la EAE. Por el contrario, la reducción del riesgo de padecer la enfermedad podría venir determinada por tratamientos crónicos con antiinflamatorios no esteroides y estrógenos (Aisen, 2002; Marin et al., 2003), igual que una dieta rica en antioxidantes (Dai et al., 2006) y ácido docosohexaenoico (DHA) (omega-3) (Calon & Cole, 2007).

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

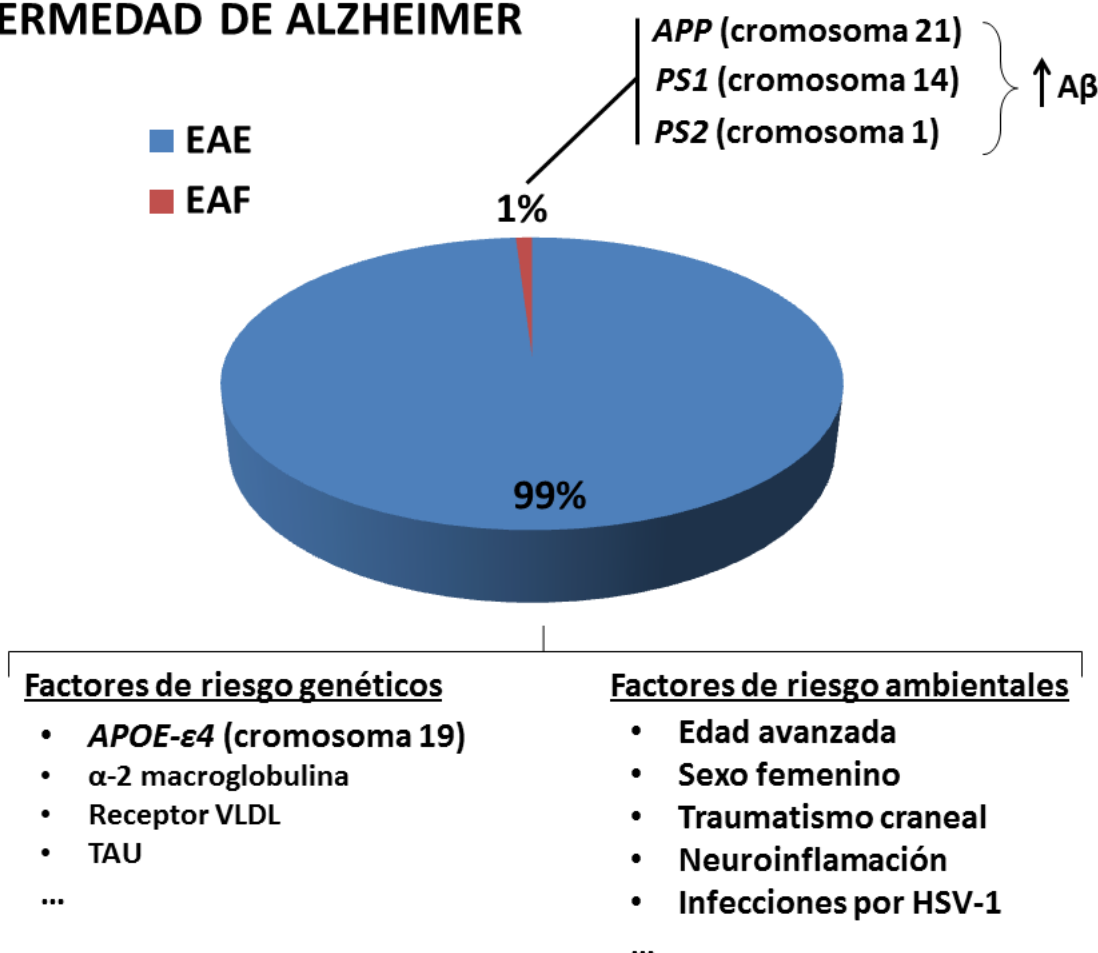


Figura I.3. Distribución de la enfermedad de Alzheimer según la variante familiar (EAF) o esporádica (EAE). El 1% de los casos de la EA se deben a la variante genética o familiar de la enfermedad, causante de la EA de aparición temprana. Estos casos se deben a diferentes mutaciones en los genes *APP*, *PS1* y *PS2*, los cuales repercuten en un aumento de la producción del péptido Aβ. El 99% restante corresponde a la variante esporádica de la enfermedad, causante de la EA de aparición tardía. Se han descrito multitud de factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales, en esta variante de la enfermedad, siendo el principal factor de riesgo genético el alelo ε4 del gen que codifica para la proteína APOE y el principal factor de riesgo ambiental la edad avanzada.

1.1.4 ORIGEN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Como ya se ha mencionado con anterioridad, no se conoce el origen o la causa que produce la EA. Debido a que tanto la EAF como la EAE presentan una cierta similitud en las manifestaciones clínicas, se propuso la “hipótesis amiloide” (Selkoe, 1991; Hardy & Higgins, 1992), según la cual la agregación del péptido A β es el origen de todo el proceso patogénico observado en la enfermedad, independientemente de que ésta sea de origen familiar o esporádico (Hardy & Allsop, 1991; Hardy & Selkoe, 2002). Por ello, la mayoría de los modelos animales desarrollados para el estudio de la patogénesis de la EA están basados en esta hipótesis (Blennow et al., 2006), así como los ensayos clínicos realizados hasta la fecha (Mandavilli, 2006). Sin embargo, otros autores han propuesto que la presencia de las placas seniles, generadas por la acumulación del péptido A β , no son la causa de la enfermedad sino un síntoma de la misma que es causado por otro proceso anterior, desconocido, que es realmente el origen de la enfermedad. Además, debido al fracaso de ensayos clínicos destinados a la generación de fármacos cuya finalidad es la eliminación del A β del cerebro y que, por lo tanto, sean capaces de modificar el desarrollo de la EA, se ha postulado que los mecanismos descritos por la hipótesis amiloide tienen poca relevancia en el desarrollo de la enfermedad o son una consecuencia en la cascada patogénica (Kokjohn & Roher, 2009; Querfurth & LaFerla, 2010). Es por todo esto que se han propuesto nuevas teorías etiológicas, además de las ya existentes, las cuales intentan explicar la muerte neuronal o paliar las consecuencias de la misma.

1.2 APP

1.2.1 EL GEN APP

El gen *APP* humano se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 21, en la región q21.3 (Kang et al., 1987; Robakis et al., 1987b; St George-Hyslop et al., 1987), entre los pares de bases 27,252,861 y 27,543,446 (GRCh37/hg19), y se encuentra, según convenio, en la hebra antisentido. Está compuesto por 18 exones distribuidos a lo largo de 290 kilobases (kb) (Yoshikai et al., 1990). Su expresión no se limita a un tejido específico sino que tiene una expresión ubicua (Schmechel et al., 1988). Se trata de un gen que se encuentra altamente conservado en mamíferos (Robakis et al., 1987a) y se han encontrado genes homólogos en otros organismos modelo como *Drosophila melanogaster* (Rosen et al., 1989), *Caenorhabditis elegans* (Daigle et al., 1993) o *Xenopus laevis* (van den Hurk et al., 2001).

1.2.1.1 Expresión del gen *APP*

El mecanismo de expresión del gen *APP* ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos. Se ha podido comprobar que el promotor proximal del gen *APP* no contiene caja TATA ni caja CCAAT, pero sí contiene una región fundamental para un correcto inicio de la transcripción (Quitschke et al., 1996) y contiene dos sitios de unión de factores nucleares, designados APB α y APB β , implicados también en la activación de la expresión del gen *APP*. El dominio denominado APB α se encuentra localizado entre las posiciones -42 y -53, donde se une el factor de transcripción USF (Vostrov et al., 1995), mientras que, en el sitio de unión a factores de transcripción denominado APB β , se ha comprobado la unión del factor de transcripción CTCF (Quitschke, 1994; Quitschke et al., 1996; Yang et al., 1999). Otros estudios han identificado, mediante el clonaje del promotor del gen *APP*, diferentes secuencias con capacidad de unión a distintos factores de transcripción, como el elemento SP1 (Pollwein, 1993), otra secuencia que reconoce un elemento de respuesta a choque térmico (HSE) (Dewji & Do, 1996), varias secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción AP-1, AP-2, AP-4, dos sitios NF κ B y un elemento de respuesta a AMPc (Salbaum et al., 1988; La Fauci et al., 1989; Williams & Tjian, 1991; Trejo et al., 1994; Grilli et al., 1995; 1996). Adicionalmente, en la región 5'-UTR del gen se ha localizado entre la posición +72 y +115 un dominio de unión a factor nuclear, denominado DAPB, con una secuencia de reconocimiento localizada exactamente entre la posición +96 y +105, cuya eliminación altera la correcta expresión del gen *APP* (Vostrov et al., 2010). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito ningún elemento del promotor distal, como elementos aisladores o *enhancer*, secuencias que son fundamentales para una expresión correcta y específica de los locus (Bonifer, 2000; Molto et al., 2009; Montoliu et al., 2009).

1.2.2 LA PROTEÍNA *APP*

Se trata de una proteína integral de membrana de tipo 1 con un único dominio transmembrana, un largo dominio extracelular N-terminal (extremo amino terminal) y un dominio citoplasmático C-terminal (extremo carboxilo terminal) (De Strooper & Annaert, 2000). Se localiza en multitud de membranas celulares como en la propia membrana plasmática (Kinoshita et al., 2003), membranas intracelulares de la red de Golgi (Xu et al., 1995), el retículo endoplásmico (RE) (Mattson et al., 2001) y en membranas lisosomales (Tagawa et al., 1992), endosomales (Kinoshita et al., 2003) y mitocondriales (Mizuguchi et al., 1992), por lo que es procesada en distintos compartimentos, madurando, en el caso de células de mamífero, a través de la ruta secretora constitutiva, siendo modificada postraduccionalmente mediante N- y O- glicosilación, fosforilación y sulfatación en residuos de tirosina (Weidemann et al., 1989).

El precursor del ARN mensajero (ARNm) es procesado mediante *splicing* alternativo para producir tres isoformas proteicas mayoritarias, nombradas en función del número de aminoácidos que contienen: APP₇₇₀, APP₇₅₁ y APP₆₉₅. La primera se trata, por lo tanto, de la isoforma más larga, derivada de la información genética codificada en los 18 exones y que contiene un dominio de 56 aminoácidos, codificado por el exón 7, que comparte homología de secuencia y puede funcionar como los inhibidores de la serín proteasa de la familia de Kunitz (KPI) (Kitaguchi et al., 1988); al igual que un dominio adyacente de 19 aminoácidos, codificado por el exón 8, semejante al antígeno MRC OX-2 que se encuentra en la superficie de neuronas y timocitos (Clark et al., 1985; Golde et al., 1990; Jacobsen et al., 1991; Mucke et al., 1994). La variante proteica APP₇₅₁ contiene el dominio KPI (exón 7) y carece del dominio OX-2 (exón 8), y la isoforma APP₆₉₅ carece de ambos dominios (exón 7 y exón 8) (**Figura I.4**). Además, en el cerebro se produce mayoritariamente la isoforma de 695 aminoácidos (Tanaka et al., 1989) y, por lo tanto, es la que ha sido objeto de un mayor estudio en las investigaciones de la EA. La relación entre los tres ARNm en la corteza frontal humana es la siguiente: 770:751:695; 5:37:58 (% del total), mientras que en cerebro de ratón la proporción es muy distinta y corresponde a: 770:751:695, 3:3:94 (% del total) (Rockenstein et al., 1995).

Hasta la fecha, se han descrito multitud de variantes menos abundantes generadas mediante *splicing* alternativo de APP, como son APP₇₁₄ que carece de los aminoácidos codificados por el exón 7 (Golde et al., 1990), otras variantes que fueron descritas en leucocitos y células de la microglía y pasaron a denominarse “APPs derivados de leucocitos” (L-APPs), en las cuales se producía un *splicing* similar al descrito con anterioridad, pero además con la eliminación de los 18 aminoácidos codificados por el exón 15, produciendo APP₇₅₂, APP₇₃₃, APP₆₉₆ y APP₆₇₇ (König et al., 1992). Se observó que estos L-APPs en cultivos primarios se expresaban en astrocitos pero no en neuronas y que en cerebro de rata sólo correspondían a un 4% del total de ARNm de APP (Sandbrink et al., 1994). Además se ha descrito también la isoforma APP₆₃₉ que excluye los exones 2, 7 y 8 (Tang et al., 2003) y otras dos variantes, APP₅₆₃ y APP₃₆₅, que excluyen los exones 14 hasta 18 y 9 hasta 18 respectivamente, perdiendo con ello la secuencia del péptido A β y la región transmembrana produciendo variantes proteicas del APP no amiloidogénicas (De Sauvage & Octave, 1989) (**Figura I.4**).

Han pasado 25 años del descubrimiento de la proteína APP (Kang et al., 1987) y son numerosos los estudios que le han asignado funciones fisiológicas en el sistema nervioso central, demostrando la implicación de la proteína APP en interacciones célula-célula (Schubert et al., 1989) o célula-matriz extracelular (Sabo et al., 2001; Soba et al., 2005). Otros estudios le han atribuido

funciones de receptor, contribuyendo a la transducción de señales mediante su asociación con proteínas heterotriméricas que unen GTP (Nishimoto et al., 1993). También se le ha asignado un papel importante en el desarrollo cerebral debido a que se ha observado una alta expresión del gen *APP* en células de la glía radial, encargadas de la correcta posición de las neuronas en la corteza embrionaria (Trapp & Hauer, 1994). Además, estudios *in vivo*, han demostrado que la proteína APP desempeña un rol en morfogénesis neuronal y en la formación de sinapsis funcionales (Leyssen et al., 2005; Priller et al., 2006). Estudios en cerebro adulto han comprobado que el gen *APP* se expresa en niveles elevados en aquellas regiones que tienen una mayor modificación sináptica (Ouimet et al., 1994) y han demostrado su implicación en el proceso de formación de la memoria (Huber et al., 1993; Zheng et al., 1996; Mileusnic et al., 2000).



Figura I.4. Transcritos de APP generados por *splicing* alternativo. El gen *APP* contiene 18 exones y a partir de él se generan por transcripción multitud de transcritos usando el mecanismo de *splicing* alternativo, que en definitiva darán origen a las diferentes isoformas proteicas del APP. De estas isoformas, las 3 mayoritarias corresponden a la APP₇₇₀ siendo la variante más larga, generada a partir de los 18 exones; la APP₇₅₁ que excluye el exón 8 (OX-2) y la APP₆₉₅, producida mayoritariamente en cerebro, que excluye el exón 8 y el exón 7 (KPI). Existen otras variantes que se generan en menor medida mediante la eliminación alternativa de los exones 2, 7, 8 ó 15 que se encuentran representadas en la parte de abajo de la figura, además de unas formas truncadas que no contienen gran parte del extremo carboxilo terminal consideradas formas no amiloidogénicas al no contener la secuencia del péptido Aβ.

1.2.2.1 Procesamiento proteolítico de la proteína APP y generación del péptido A β

La proteína APP sufre un procesamiento proteolítico durante el cual se origina el péptido A β (Kang et al., 1987) que es producido durante el metabolismo constitutivo de la célula (Haass et al., 1992). Existen dos rutas principales de procesamiento de la proteína APP llevadas a cabo por tres enzimas, denominadas α -secretasa, β -secretasa, las cuales cortan en el dominio extracelular, y γ -secretasa, que corta en el dominio transmembrana. Las enzimas que actúan como α -secretasas pertenecen a la familia de proteínas adamalislina o ADAMs (desintegrinas y metaloproteinasas) y entre ellas se incluye ADAM 17 (también llamada TACE o convertasa del factor α de necrosis tumoral), ADAM 10 y ADAM 9 (Asai et al., 2003). Las enzimas β -secretasas han sido identificadas como aspartil proteasas asociadas a membrana y se han denominado BACE1 y BACE2 (proteasa que corta en el sitio β de la proteína APP) (Farzan et al., 2000; Vassar, 2004). Y por último, la enzima γ -secretasa está formada por un complejo: PS1 ó PS2, que poseen actividad catalítica; nicastrina, APH-1 (*anterior pharynx defective-1*) y PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) (Kimberly et al., 2003).

La primera ruta, denominada no amiloidogénica, es la ruta predominante de procesamiento de APP, y es nombrada así porque excluye la generación del péptido β -amiloide (Selkoe, 1991). Durante esta ruta la enzima α -secretasa realiza un corte en la proteína APP, entre los aminoácidos 687 y 688 (siguiendo la nomenclatura de la isoforma 770) correspondientes a los residuos 16 y 17 del péptido A β , generando la secreción del dominio N-terminal, que es una forma truncada de la proteína APP, denominada APP soluble α (sAPP α) (Allinson et al., 2003) que está implicado en sinaptogénesis (Morimoto et al., 1998) y tiene además una gran importancia en la formación y consolidación de la memoria (Huber et al., 1993; Meziane et al., 1998) así como en el almacenamiento de la misma (Roch et al., 1994). Por otro lado, el fragmento C-terminal resultante de 83 aminoácidos, denominado C83 ó α -CTF, permanece anclado en la membrana para, seguidamente, ser procesado por la enzima γ -secretasa, cortando entre los aminoácidos 712, 714 ó 715, correspondientes a los residuos 40, 42 ó 43 del péptido A β , generando un pequeño péptido denominado p3 (Haass et al., 1993) y un fragmento intracelular de APP denominado AICD (*APP Intracellular Cytoplasmic Domain*) ó γ -CTF (Haass et al., 1993) (**Figura I.5**).

La segunda ruta es la amiloidogénica, durante la cual se genera el péptido A β y de nuevo necesita la acción secuencial de dos proteasas (Haass, 2004). El primer corte es llevado a cabo por la enzima β -secretasa en el extremo N-terminal de la secuencia del péptido A β , entre los aminoácidos 671 y 672, promoviendo la liberación del fragmento APP soluble β (sAPP β) y la generación de un fragmento C-terminal, anclado en la membrana, de 99 aminoácidos denominado C99 ó β -CTF

(Vassar, 2001). Por último, el procesamiento de C99 por el complejo γ -secretasa da lugar al péptido $A\beta$ y al fragmento γ -CTF (Gandy, 2005) (**Figura I.5**). Esta ruta amiloidogénica genera principalmente una especie de 40 aminoácidos denominado $A\beta_{40}$ y una especie de 42 aminoácidos denominado $A\beta_{42}$. De las dos especies, aproximadamente el 90% corresponde a la $A\beta_{40}$ y, a pesar de que ambas especies son neurotóxicas e insolubles, el péptido $A\beta_{42}$ se agrega con mayor facilidad y, por lo tanto, es más proclive a la formación de las placas amiloides (Iwatsubo et al., 1994).

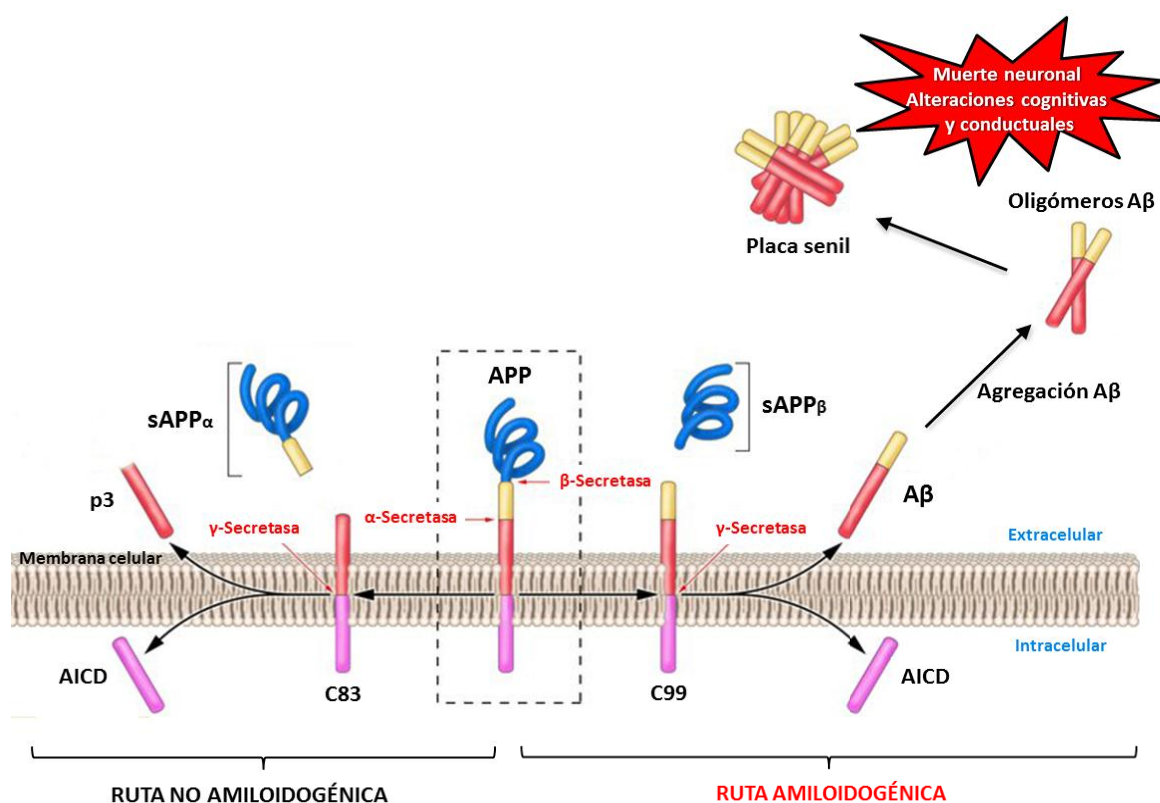


Figura I.5. Esquema del procesamiento proteolítico de la proteína APP. A la izquierda se representa la ruta no amiloidogénica, que es la mayoritaria en condiciones fisiológicas normales, y se produce por la acción de la α -secretasa y γ -secretasa, generando péptidos fisiológicos con acciones tróficas neuronales. A la derecha se representa la ruta amiloidogénica, que se da, sobre todo, en situaciones de edad avanzada o con determinadas patologías y está mediada por el corte de la β -secretasa y γ -secretasa, generando el péptido $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, que en determinadas condiciones puede agregarse y precipitar en el espacio extracelular, con efectos neurotóxicos, formando las placas seniles.

1.2.3 MUTACIONES EN EL GEN APP: LA MUTACIÓN “SUECA”

Hasta la fecha se han descrito hasta 33 mutaciones patogénicas en el gen *APP* (www.molgen.ua.ac.be/ADMutations) detectadas en 90 familias de enfermos de EA en los que la enfermedad se declara de aparición temprana. Estas mutaciones se encuentran localizadas en regiones críticas para el procesamiento fisiológico de la proteína APP y dichas alteraciones afectan significativamente el metabolismo normal de la proteína (Brouwers et al., 2008). Entre estas diferentes

mutaciones se pueden destacar algunas como: la mutación “Londinense” (V717I) (Goate et al., 1991), la mutación “Indiana” (V717F) (Murrell et al., 1991), ambas afectando al codón 717, sitio cercano del corte de la enzima γ -secretasa; la mutación “Ártica” (E693G) (Kamino et al., 1992), la mutación “Holandesa” (E693Q) (Levy et al., 1990), las cuales se encuentran en la región central del péptido A β y provocan un incremento de la agregación de éste, lo cual conlleva al acúmulo precoz de oligómeros (Brouwers et al., 2008); y la doble mutación “Sueca” (K670N/M671L), afectando a los codones 670 y 671 (Mullan et al., 1992), lugar de corte de la enzima β -secretasa y que promueve el corte por dicha enzima (**Figura I.6 y Tabla I.1**). Para la nomenclatura de los codones, donde se encuentra la mutación, se tiene en cuenta siempre la isoforma más larga de la proteína, la de 770 aminoácidos.

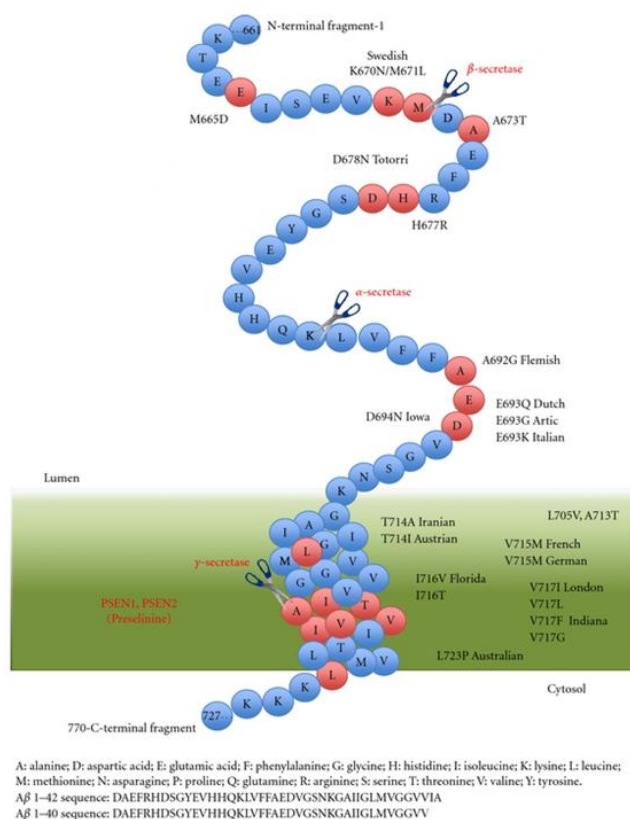


Figura I.6. Mutaciones en la proteína APP. Se representa la secuencia de aminoácidos de la proteína APP en su región transmembrana (zona verde) y correspondiente a la región donde se localiza el péptido A β . Se indica la posición y los cambios aminoacídicos (aminoácidos en rojo) de varias mutaciones descritas y los tres principales sitios de corte llevados a cabo durante el procesamiento proteolítico (β -secretasa, α -secretasa y γ -secretasa). Abajo se indica el aminoácido que corresponde a cada letra y la secuencia del péptido A β 40 y A β 42.

La mutación “Sueca” debe su nombre a que se identificó por primera vez en una familia sueca que padecía la EA de inicio temprano (EAF). La mutación en realidad consiste en dos mutaciones puntuales en el exón 16 del gen APP. En el codón 670 (AAG), que codifica para Lisina (K), se produce una transversión guanina-timina, por lo que el nuevo codón AAT codifica para Asparagina (N). En el siguiente codón, el 671, también se produce una transversión, esta vez adenina-citosina, y el codón ATG que codifica para Metionina (M) pasa a ser, tras la mutación, un codón CTG, que codifica para Leucina (L). Estos cambios ocurren inmediatamente antes del aminoácido N-terminal del péptido A β y producen un incremento en la producción y secreción del péptido A β debido a la acción llevada a cabo por la β -secretasa (Haass et al., 1995).

Nombre de la mutación	Exón / Dominio	Tipo de mutación	Genómico	Proteína	Referencia
Holandesa	Exón 17 / N-Term	Mutación puntual con sustitución de aminoácido	g.275269G>C	E693Q	Levy et al., 1990
Londinense	Exón 17 / TM-1	Mutación puntual con sustitución de aminoácido	g.275341G>A	V717I	Goate et al., 1991
Indiana	Exón 17 / TM-1	Mutación puntual con sustitución de aminoácido	g.275341G>T	V717F	Murrell et al., 1991
Ártica	Exón 17 / N-Term	Mutación puntual con sustitución de aminoácido	g.275270A>G	E693G	Kamino et al., 1992
Sueca	Exón 16 / N-Term	Doble mutación puntual con sustitución de dos aminoácidos	g.[269498G>T;269499A>C]	K670N/M671L	Mullan et al., 1992

Tabla I.1. Mutaciones en el gen *APP*. En esta tabla se incluyen las cinco primeras mutaciones en el gen *APP*, descritas en familias que padecían EA de aparición temprana, de las treinta y tres totales descritas hasta la fecha.

1.3 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA EA

Los ratones transgénicos se han convertido en la principal herramienta de estudio por la comunidad científica, usándolos como modelos animales de investigación en el grupo de las enfermedades donde acontece un proceso de neurodegeneración, como es el caso de la EA, para tratar de comprender la etiología, buscar un tratamiento eficaz e incluso poner fin a la enfermedad. Los ratones ofrecen muchas ventajas en la investigación científica ya que son fáciles de criar, su periodo de gestación es corto y su progenie abundante; su pequeño tamaño hace fácil su manejo, su bien documentada genética y la gran cantidad de mutantes existentes y, sobre todo, porque ha sido secuenciado la totalidad de su genoma (Waterston et al., 2002), encontrando una homología de aproximadamente el 95% con el genoma humano. En cuanto a las investigaciones relativas a las capacidades cognitivas, responden bien a tareas de aprendizaje y de memoria basándose en la activación de áreas específicas del cerebro normalmente comprometidas en pacientes con EA (Kobayashi & Chen, 2005).

Se han generado multitud de ratones transgénicos como modelo animal de la EA, y su número hoy en día sigue creciendo. Inicialmente se generaron modelos animales produciendo un daño colinérgico y evaluando la mejoría en la capacidad de aprendizaje del animal tras la administración de un fármaco (Smith, 1988). Sin embargo, estos primeros modelos no tuvieron una gran aceptación y, de hecho, apenas son utilizados en la actualidad debido a que trataban de emular síntomas de la enfermedad, pero no explicaban los diferentes procesos patogénicos que conducían al desarrollo de esos síntomas. Esto también podría deberse a que no ha sido descrita la formación de

placas de A β de forma natural en roedores durante el envejecimiento (Cork et al., 1988; Jucker et al., 1992), mientras que sí se han encontrado placas en primates, perros, gatos (Cummings et al., 1996a; Cummings et al., 1996b; Cummings et al., 1996c) y osos (Cork et al., 1988). A pesar de encontrarse muy conservado el péptido A β en mamíferos (Johnstone et al., 1991), el cambio de los 3 residuos aminoacídicos en las posiciones 5, 10 y 13 de la secuencia A β murina respecto a la humana, podría ser suficiente para evitar la deposición de placas amiloides en el cerebro en roedores (Bush et al., 1994).

A principios de los años 90, se descubrieron, en las formas familiares de la EA, mutaciones en el gen *APP* (Goate et al., 1991; Mullan et al., 1992) y en los genes *PS* (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995) que codifican para la proteína precursora del péptido A β y para las proteínas encargadas de su procesamiento respectivamente, sugiriendo un papel causal de estas proteínas en la enfermedad que, junto a los avances obtenidos en la tecnología de transgénesis, condujo a la generación de modelos animales transgénicos para su estudio. La manipulación genética llevada a cabo consistió en la generación de ratones *knock-out*, mediante la eliminación del gen *App* murino (Zheng et al., 1996) o bien con la introducción de mutaciones típicas de estas formas hereditarias de EA en el cromosoma 21 (*APP*) (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991) en el 14 (*PS1*) (Sherrington et al., 1995) o en el 1 (*PS2*) (Rogaev et al., 1995); o incluso en dos de estos cromosomas. Con estas mutaciones ha sido posible expresar las formas patogénicas del gen *APP* y aumentar en gran medida la producción de A β humano de forma reproducible, permitiendo evaluar el proceso de formación de placas amiloides en áreas límbicas y corticales de ratón, de forma similar a lo que ocurre en humanos, así como los cambios que producen en la pérdida de las capacidades cognitivas de los mismos. De este modo, se generaron con éxito modelos capaces de expresar el gen *APP* silvestre, fragmentos del gen *APP*, el gen *APP* mutado y otros genes relacionados con la enfermedad (Kammesheidt et al., 1992; Higgins et al., 1994; Games et al., 1995; LaFerla et al., 1995; Irizarry et al., 1997a; Johnson-Wood et al., 1997; Lamb et al., 1997; Nalbantoglu et al., 1997).

Los modelos animales más utilizados se describen a continuación en orden cronológico y se resumen en la **Tabla I.2**.

1.3.1 RATÓN APP YAC

1.3.1.1 Cromosomas artificiales de levadura (YAC)

Los cromosomas artificiales de levaduras (YAC) fueron descritos por primera vez en 1983 (Murray & Szostak, 1983). Los YACs son vectores de clonación que contienen secuencias de

centrómero y telómeros propios de levadura, consiguiendo comportarse como un cromosoma propio de la levadura. Esto permite clonar en estas levaduras secuencias de ADN de otras especies que comprenden desde unas pocas decenas de kb hasta más de 1 Mb (Burke et al., 1987). Son utilizados en la construcción de genotecas genómicas de ratón y humano (Larin et al., 1991). Brevemente, los YACs contienen: una secuencia de replicación autónoma (ARS1), el centrómero del cromosoma IV (CEN4), que se encarga de la correcta segregación del YAC durante la división celular; secuencias teloméricas (TELS) y marcadores de selección auxotróficos de levaduras.

A principios de los años 90 se empezaron a utilizar los YACs como vehículo para la generación de animales transgénicos en los que se podía insertar grandes cantidades de ADN (Schedl et al., 1992; Schedl et al., 1993a; Schedl et al., 1993b; Montoliu et al., 1993). Los primeros ratones transgénicos con YACs se generaron utilizando tres procedimientos diferentes, en tres laboratorios independientes y de forma simultánea: mediante fusión de esferoblastos con células ES (Jakobovits et al., 1993); mediante microinyección de oocitos fecundados con YACs purificados (Schedl et al., 1993b) y mediante lipofección en células ES con YACs purificados (Strauss et al., 1993), obteniéndose en los tres casos niveles de expresión óptima para el transgén. Para finalizar, los YACs tienen como ventaja el poder modificar su secuencia mediante el sistema de recombinación homóloga propia de levaduras (Schlessinger, 1990; Montoliu et al., 1996; Green et al., 1999; Giraldo et al., 1999; Moreira et al., 2004), permitiendo con ello, por ejemplo, la introducción de mutaciones específicas de forma limpia.

1.3.1.2 Generación del ratón transgénico con un YAC de APP

En 1993, tres grupos publicaron, casi de forma simultánea, la generación de un ratón transgénico con un mismo YAC de 650 kb (clon B142F9 *Washington University YAC library*), denominado YAC APP-8, el cual incluía la secuencia completa del gen *APP* y regiones colindantes tanto en 5' como en 3' del gen (Buxbaum et al., 1993; Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993). En estos ratones se consiguió una expresión en cerebro del gen *APP* humano similar al *App* endógeno de ratón, sin observarse la formación de placas o cambios neuropatológicos relevantes. Los tests de comportamiento realizados a estos ratones revelaron que no había diferencias en el aprendizaje con sus hermanos de camada (Murai et al., 1998). Posteriormente, en 1997, se introdujo la mutación "Sueca" y la "Londinense" (K670N/M671L + V717I), asociadas a la EAF, en este YAC APP-8 procedente del clon B142F9, y se generaron ratones transgénicos con esta construcción, en los cuales se observaba una mayor cantidad del péptido A β 40 y A β 42, tanto en sangre como en suero, pero sin la existencia de placas (Lamb et al., 1997). Sin embargo se observó que, usando diferentes

fondos genéticos de ratón, se conseguía alterar el metabolismo y el depósito de A β (Lehman et al., 2003).

La secuenciación del genoma humano (Pennisi, 2000; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) reveló que el YAC utilizado para la generación de estos ratones, además del gen *APP*, contenía el gen que codifica para el factor de transcripción GABPA, lo que podía generar un fenotipo indeseado o interferir en la expresión del gen *APP* (Lamb et al., 1997).

1.3.1.3 Factor de transcripción GABPA (E4TF1-60)

La regulación de la transcripción del ADN en eucariotas viene determinada por factores de transcripción. Estos factores pueden ser basales, que son necesarios para iniciar la síntesis de ARN en cualquier promotor, pero también pueden ser factores específicos de cada gen. Los factores de transcripción pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, uniéndose a otros factores, o uniéndose directamente a la ARN polimerasa (Latchman, 1997b).

El factor de transcripción E4TF1 pertenece a la familia de los factores de transcripción ETS (LaMarco et al., 1991; Thompson et al., 1991). Está compuesto por una subunidad de unión al ADN, denominada E4TF1-60 ó GABPA (*GA-binding protein alpha chain*) y otra de transactivación de la maquinaria celular, formado por el E4TF1-53 y E4TF1-47 (Watanabe et al., 1988; Watanabe et al., 1990; Watanabe et al., 1993; Sawada et al., 1994). La subunidad GABPA es capaz de unirse por sí sola y de forma específica a la secuencia 5'-CGGAAA/G-3', pero necesita formar heterodímeros o complejos tetrámicos con las subunidades 53 y 47 para poder activar la transcripción (Watanabe et al., 1990; Watanabe et al., 1993; Sawada et al., 1994).

En cuanto a sus funciones, el factor de transcripción GABPA está implicado en la expresión de varias proteínas, como las moléculas de adhesión integrinas β 2 (CD18) específicas de leucocito (Rosmarin et al., 1995), del supresor de tumores de retinoblastoma (Savoysky et al., 1994), la proteína esteroidea masculina 16 α -hidroxilasa (Yokomori et al., 1995) y se ha visto relacionado con la activación de genes inmediatamente tempranos en adenovirus (Watanabe et al., 1988).

1.3.2 RATÓN PDAPP

En 1995 el Dr. Games y colaboradores describieron por primera vez el ratón PDAPP (Games et al., 1995), siendo el primer modelo de ratón para EA que contenía la mutación "Indiana" (V717F). Contiene una construcción con un minigen de *APP* humano, que es capaz de producir las isoformas

695, 751 y 770, y se encuentra bajo el control del promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (en inglés, PDGF, por *platelet derived growth factor*) produciendo una sobreexpresión del transgén que provoca una elevación de los niveles de la proteína APP humana hasta diez veces sus valores fisiológicos y, debido a que esta mutación se encuentra cerca del sitio de corte de la γ -secretasa, se conseguía una mayor proteólisis de la proteína APP, que finalmente provocaba un aumento en la producción del péptido A β 42 en el cerebro (Suzuki et al., 1994). Los péptidos A β 40 y A β 42 humanos se expresan 5 y 14 veces respectivamente, respecto a los niveles endógenos de A β de ratón. En último término, se podían observar placas neuríticas de núcleo denso o difuso, similares a las observadas en humanos con EA, rodeadas de neuritas distróficas, astrocitosis, microgliosis y pérdida sináptica, pero sin la observación de ovillos neurofibrilares (Games et al., 1995). Estas placas se observan en estos ratones entre los 6-9 meses de edad, en la corteza, en el hipocampo y en vasos sanguíneos (Games et al., 1995; Irizarry et al., 1997b). Además, las placas llegaban a ocupar el 50% en las regiones del área cortical, mientras que en enfermos de Alzheimer tienden a estar entre el 6 y el 12% (Hyman et al., 1993; Mufson et al., 1999).

Funcionalmente, se ha descrito que los ratones PDAPP presentan varias anomalías de comportamiento, como en la prueba de memoria espacial del tanque de Morris [*Morris-Water Maze* (Morris et al., 1982; Morris, 1984; Moechars et al., 1999; Kelly et al., 2003; Van Dam et al., 2003; Lesne et al., 2006)] o los déficits de memoria observados en el test de reconocimiento de objetos [*novel object recognition task (NOR)* (Dodart et al., 2000; Dodart et al., 2002; Dere et al., 2007; Squire et al., 2007; Mouri et al., 2007; Scholtzova et al., 2008)], ambos a los 3-4 meses de edad (Dodart et al., 1999). Estos déficits en el aprendizaje progresaban con la edad, pero no se pudo asociar este déficit cognitivo con la deposición del A β debido a que este último sucedía a edades más avanzadas. Posteriormente se pudo comprobar que los déficits cognitivos encontrados en estos ratones a la edad de 3-4 meses podían deberse a que el hipocampo de estos ratones sufría una atrofia progresiva durante los 3 primeros meses de vida (Redwine et al., 2003) detectable mediante análisis neuroanatómicos (Dodart et al., 1999) y de resonancia magnética nuclear (Redwine et al., 2003).

1.3.3 RATÓN Tg2576

En 1996 se generó el ratón Tg2576 por Karen Hsiao y colaboradores (Hsiao et al., 1996), y desde entonces ha sido posiblemente el modelo más utilizado para el estudio de la EA. La línea de ratón Tg2576 contiene la doble mutación "Sueca" (K670N/M671L) en el ADN complementario (ADNc) que codifica para la isoforma 695 del gen *APP* humano y se encuentra bajo el control del promotor del gen de la proteína priónica (en inglés, PrP, por *prionic protein*) de hámster, lo que garantiza una alta

expresión en el cerebro. Los ratones heterocigotos presentan placas neuríticas a partir de los 11-13 meses de edad (Hsiao et al., 1996) en la región entorrinal, extendiéndose después al hipocampo y corteza (McGowan et al., 1999; Kawarabayashi et al., 2001). Estos ratones expresan el gen *APP* humano mutante 5.5 veces más que el gen *App* murino endógeno en el cerebro.

Se han realizado multitud de estudios conductuales en el ratón Tg2576, demostrando, en los primeros tests realizados, una correlación entre la pérdida cognitiva de los ratones y la edad de los mismos (Hsiao et al., 1996). En los siguientes años los tests se fueron ampliando por varios grupos, observando déficits en el laberinto en "Y" [*Y-Maze* (Lalonde, 2002; Hughes, 2004; Wilcock et al., 2004; Rustay et al., 2010)] donde se observaba un comportamiento perseverante a los 10 meses de edad, pérdida de la memoria espacial a los 7 meses de edad en el tanque de Morris (Lesne et al., 2006) y déficits en la prueba de evitación activa (*active avoidance test*) (Arendash & King, 2002). Estos ensayos demostraron que los déficits cognitivos se manifestaban antes de la aparición de las placas, lo que hizo que muchos autores planteasen la hipótesis de que el responsable de estos déficits en el aprendizaje fuese la forma soluble del péptido A β y no la que forma placas (Hardy & Selkoe, 2002).

1.3.4 RATÓN TgAPP23

El ratón TgAPP23 fue generado por el grupo Novartis Pharma en 1997 (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Contiene la doble mutación "Sueca" (K670N/M671L) en el ADNc que codifica para la isoforma 751 del gen *APP* humano y, a diferencia del ratón Tg2576, se encuentra bajo el control del promotor del gen *Thy-1.2*, logrando una expresión 7 veces superior a la endógena, que provocaba la aparición de placas en el cerebro aproximadamente a la edad de 6 meses acompañadas de astrocitosis y microgliosis en las regiones neocorticales y el hipocampo (Sturchler-Pierrat et al., 1997), aunque otros autores no fueron capaces de detectar las placas hasta los 15-18 meses (Boncristiano et al., 2005; Balducci et al., 2010b). Se observó que este ratón también desarrollaba angiopatía amiloide cerebral, convirtiéndose en un gran modelo para el estudio de esta enfermedad (Winkler et al., 2001). Además, en dicho ratón, se describió por primera vez muerte neuronal en la región CA1 del hipocampo a la edad de 14-18 meses (Calhoun et al., 1998).

En cuanto a los ensayos conductuales realizados en el ratón TgAPP23, se han descrito déficits de aprendizaje y de memoria en el tanque de Morris a la edad de 3 y 6 meses, que además eran dependientes de la edad (Kelly et al., 2003) y cuando todavía no se encontraban placas neuríticas, pero sí en un periodo en el que los niveles de A β soluble se mantenían constantes (Van Dam et al., 2003; Balducci et al., 2010b).

1.3.5 RATONES TgJ9 y TgJ20

Los ratones TgJ9 y TgJ20 se generaron en el año 2000 (Mucke et al., 2000). Ambos contienen dos mutaciones en el ADNc que codifica para la isoforma 770 del gen *APP* humano: la doble mutación “Sueca” y la mutación “Indiana” (K670N/M671L + V717F). Esta construcción se encuentra bajo el control del promotor *PDGF*. Se observó que la acumulación de A β era baja en el ratón TgJ9 y bastante más elevada en el ratón TgJ20 (Mucke et al., 2000; Chin et al., 2005), observándose la aparición de placas neuríticas a los 8-10 meses de edad en la corteza cerebral y giro dentado. Los ratones TgJ20 mostraron déficits de aprendizaje y memoria en el tanque de Morris (Palop et al., 2003; Chen & Bear, 2007).

1.3.6 RATÓN TgCRND8

En el año 2001 se generó el ratón TgCRND8 como un modelo de la EAF que además era capaz de desarrollar placas a la edad de 3 meses (Chishti et al., 2001). Contiene la mutación “Sueca” y la mutación “Indiana” (K670N/M671L + V717F), pero, a diferencia del ratón TgJ9 y TgJ20, el ratón TgCRND8 tiene las mutaciones en el ADNc de la isoforma 695 del APP humano y está bajo el control del promotor *PrP* de hamster. Estos ratones desarrollan una patología agresiva de la enfermedad debido al alto incremento en la relación A β 42/A β 40. La expresión del gen *APP* humano mutante es alrededor de 5 veces más que el gen *App* de ratón endógeno.

El ratón TgCRND8 presenta alta mortalidad y se han descrito déficits cognitivos en el tanque de Morris (Chishti et al., 2001), en los tests de reconocimiento de objetos y de miedo condicionado [*fear conditioning* (Phillips & LeDoux, 1992)] (Greco et al., 2010) y en los tests de sobresalto acústico (*auditory startle*) y de la inhibición prepulso de la respuesta a sobresaltos (*prepulse inhibition of startle*) (McCool et al., 2003).

1.3.7 RATONES “APP Dutch”, ARC6 y ARC48

La amiloidosis vascular es una característica de los pacientes de EA que portan la mutación “Holandesa”, la cual se encuentra dentro del dominio A β . Esta mutación, en lugar de causar depósitos amiloides, causa una forma hereditaria de hemorragia cerebral. Es por ello, por lo que se decidió generar el ratón transgénico “APP Dutch”, que contenía en el gen *APP* humano la mutación “Holandesa” (E693Q) bajo el control del promotor del gen *Thy-1.2* (Herzig et al., 2004).

También se considera importante la mutación “Ártica”, que también se encuentra dentro de la secuencia de A β , y que está asociada a la mayor capacidad de formar fibras por parte del péptido, independientemente de la relación A β 42/A β 40. Para el estudio de esta mutación se generaron los ratones ARC6 y ARC48, que contenían una construcción del gen *APP* humano portador de la mutación “Ártica” bajo el control del promotor PDGF (Cheng et al., 2004).

Un aspecto interesante que distingue a los ratones ARC6 y ARC48 es que el primero no muestra déficits cognitivos en la memoria espacial dependiente del hipocampo, mientras que el segundo sí (Cheng et al., 2007). Esta diferencia parece estar asociada a la presencia de especies A β solubles, pero no a la deposición de placas. La razón por la que los ratones “APP Dutch” tienen depósitos vasculares mientras que estos ratones, que portan la mutación “Ártica”, tienen depósitos de A β en el parénquima cerebral, podría deberse a la relación A β 40/A β 42. Una relación más alta conduciría a depósitos vasculares, mientras que una relación menor conduciría preferentemente a la acumulación del péptido en dicho parénquima (Herzig et al., 2004). Sin embargo, los depósitos del parénquima han sido descritos también con una alta relación A β 40/A β 42 (Cheng et al., 2004).

1.3.8 RATONES DOBLES TRANSGÉNICOS

El desarrollo alcanzado por la genética ha permitido el descubrimiento de nuevas mutaciones en cromosomas diferentes al 21, donde se encontraba el gen *APP*, que eran causantes de nuevos casos EA de aparición temprana (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995; Aldudo et al., 1998). Estas mutaciones se daban, concretamente, en los genes de *PS1* y *PS2*, lo que provocó la generación de nuevos modelos transgénicos, que contenían tanto estos genes como sus variantes mutadas, en los que se ha descrito un incremento en la cantidad de A β 42/43 (Duff et al., 1996; Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997; Qian et al., 1998), demostrando el papel fundamental de las presenilinas en el procesamiento *in vivo* de la proteína APP. Sin embargo, no fue capaz de describirse en ninguno de estos modelos ninguna alteración neuropatológica característica de la EA.

Una forma rápida de promover la aparición de placas amiloidogénicas en modelos murinos de EA consistió en la generación de ratones con la construcción de los genes *APP* y *PS1* humanos mutados (APP_{K670N/M671L} + PS1_{A246E}), los cuales fueron capaces de mostrar las placas a partir de los 9 meses de edad (Borchelt et al., 1997), y mediante el cruzamiento del ratón Tg2576 con un ratón que expresaba el gen *PS1* humano mutado (PS1_{M146L}), dando lugar a la generación de la línea transgénica de ratón PSAPP (Holcomb et al., 1998), que presentaban placas a los 3-6 meses de edad (McGowan et al., 1999; Kurt et al., 2001). Más adelante también se generó el ratón TASTPM, que contenía el gen

APP humano con la mutación “Sueca” bajo el control del promotor *Thy-1* y el gen *PS1* humano mutado también bajo el control del promotor *Thy-1* (*APP*_{K670N/M671L} + *PS1*_{M146V}) y presentaba placas de Aβ visibles a los 3 meses de edad (Howlett et al., 2004; Howlett et al., 2008). En todos estos ratones dobles transgénicos, las placas estaban formadas por fragmentos de Aβ40 y Aβ42 con estructura compacta y ocupando áreas corticales e hipocámpales (McGowan et al., 1999; Howlett et al., 2004). También se han generado modelos dobles transgénicos que eran capaces de expresar el gen *APP* humano con la mutación “Sueca” y el gen *PS1* humano que presentaba delección del exón 9 (*APP*_{K670N/M671L} + *PS1*_{dE9}). Al igual que en la patología en humanos, las placas aparecían con un aspecto “algodonoso” en lugar de placas de núcleo denso (Lee et al., 1997; García-Alloza et al., 2006). Se han descrito también déficits de memoria espacial y de reconocimiento en dichos modelos dobles transgénicos (Howlett et al., 2004; Dinamarca et al., 2008; Trinchese et al., 2008).

A pesar de la existencia de los modelos de ratones dobles transgénicos, siguen sin existir indicios de neurodegeneración, ni en el córtex, ni en el hipocampo, al igual que tampoco hay signos de ovillos neurofibrilares (Takeuchi et al., 2000; Urbanc et al., 2002). En los estudios conductuales realizados no fueron capaces de encontrar diferencias en el aprendizaje entre los dobles transgénicos y los simples, y sólo había diferencias significativas con los controles a una edad de 12-14 meses (Holcomb et al., 1998).

1.3.9 RATONES TRIPLES TRANSGÉNICOS

Las mutaciones descubiertas en el gen *TAU* asociadas a la demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), estrechamente relacionada con la EA (Spillantini et al., 1997; Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Ghetti et al., 2008; Goedert et al., 2012), han permitido la generación de ratones transgénicos capaces de desarrollar ovillos neurofibrilares, e incluso neurodegeneración (Lewis et al., 2000; Götz et al., 2001; Higuchi et al., 2002; Tatebayashi et al., 2002; Terwel et al., 2005).

Estos modelos, al igual que los anteriormente descritos, han sido capaces de reproducir por separado alguna de las patologías de la EA, pero no de forma combinada. Para superar esto, el Dr. Oddo y su grupo generaron una nueva línea triple transgénica, en la cual, además de presentar los genes *APP* y *PS1* humanos mutados, se insertó una mutación en el gen *TAU* humano asociada a FTDP-17 (*APP*_{K670N/M671L} + *PS1*_{M146V} + *TAU*_{P301L0}) (Oddo et al., 2003a). Este ratón triple transgénico ha sido un modelo útil debido a que en él convergen muchas de las neuropatologías asociadas a la EA: presenta depósitos intracelulares de péptido Aβ, seguido de formación de placas extracelulares en

corteza y posteriormente en hipocampo, haciéndose evidentes a los 12 meses de edad; y lo más importante, son capaces de desarrollar ovillos neurofibrilares similares a los humanos, cuya aparición es posterior a la aparición de placas, apoyando la hipótesis de la cascada amiloide (Oddo et al., 2003b). Respecto a los aspectos funcionales, el modelo triple transgénico muestra inhibición de la potenciación a largo plazo (*LTP*, del inglés *long-term potentiation*), lo cual se correlaciona con deficiencias en plasticidad sináptica y en la capacidad de aprendizaje (Oddo et al., 2003a; Oddo et al., 2006; Pietropaolo et al., 2008). De nuevo en este modelo se puede apreciar que las deficiencias en la plasticidad sináptica son anteriores a la aparición de las placas, planteándose la posibilidad de que sea el A β intracelular el responsable (Oddo et al., 2003a; Oddo et al., 2006). Recientemente se han generado también nuevos modelos triples transgénicos que presentan los genes *APP*, *PS2* y *TAU* humanos mutados (Rhein et al., 2009; Grueninger et al., 2010).

Línea transgénica (Referencia)	Isoforma Mutación/es	Promotor	Daños cognitivos	Características neuropatológicas
PDAPP (Games et al., 1995)	minigen hAPP Indiana: V717F	PDGF	Memoria de referencia espacial y de trabajo	Placas A β (6-9 meses), neuritis distróficas, gliosis, pérdida de densidades sinápticas
Tg2576 (Hsiao et al., 1996)	hAPP 695 Sueca: K670N/M671L	PrP Hamster	Memoria de reconocimiento y de trabajo, memoria contextual, alternancia en laberinto "Y"	Placas A β (11-13 meses), neuritis distróficas, astrogliosis, microgliosis
TgAPP23 (Sturchler-Pierrat et al., 1997)	hAPP 751 Sueca: K670N/M671L	Thy-1.2 Murino	Memoria de referencia espacial y de trabajo, evitación pasiva, memoria de reconocimiento	Placas A β (6-12 meses), A β cerebrovascular, neuritis distróficas, pérdida neuronal en la región CA1 hipocampal, astrogliosis, microgliosis
TgJ20 (Mucke et al., 2000)	hAPP 770 Sueca/Indiana: K670N/M671L + V717F	PDGF	Memoria de referencia espacial y de trabajo, memoria de reconocimiento	Placas A β (8 meses), gliosis
TgCRND8 (Chishti et al., 2001)	hAPP 695 Sueca/Indiana: K670N/M671L + V717F	PrP Hamster	Memoria de referencia espacial y de trabajo, memoria de reconocimiento	Placas A β (3 meses), neuritis distróficas, astrogliosis, microgliosis
TgAPP/PS1-A246E (Borchelt et al., 1997)	hAPP 695 Sueca: K670N/M671L PS1: M246E	Thy-1	-	-
TgAPP/PS1-dE9 (Lee et al., 1997)	hAPP 695 Sueca: K670N/M671L PS1: dE9	PrP Murino	-	-
TgPSAPP (Holcomb et al., 1998)	hAPP 695 Sueca: K670N/M671L PS1: M146L	PDGF	Memoria de referencia espacial y de trabajo, memoria de reconocimiento	Placas A β (3-6 meses), neuritis distróficas, astrogliosis, microgliosis
TgTASTPM (Howlett et al., 2004)	hAPP 695 Sueca: K670N/M671L PS1: M146V	Thy-1	-	Placas A β (3-6 meses), astrogliosis, microgliosis, pérdida neuronal localizada
TgAPP/PS1/TAU (Oddo et al., 2003a)	hAPP 695 Sueca: K670N/M671L PS1: M146L TAU: P301L	Thy-1 Murino	Deterioro progresivo de la memoria en función de la edad correlacionada con A β intraneuronal	3-4 meses: acumulación de A β intracelular en la corteza cerebral; 6 meses: acumulación de A β intracelular en la región CA1 hipocampal; 12 meses: depósitos de A β extracelulares en corteza e hipocampo y ovillos neurofibrilares en hipocampo

Tabla I.2. Resumen de los modelos transgénicos de ratón más utilizados para el estudio de la EA. Se indica la mutación relacionada con la EAF, el promotor y la isoforma de APP que se ha introducido en cada modelo, así como los fenotipos observados. El área marcada en verde corresponde a modelos dobles transgénicos y la roja al triple transgénico (Balducci & Forloni, 2011).

1.3.10 VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS MODELOS EN EL ESTUDIO DE LA EA

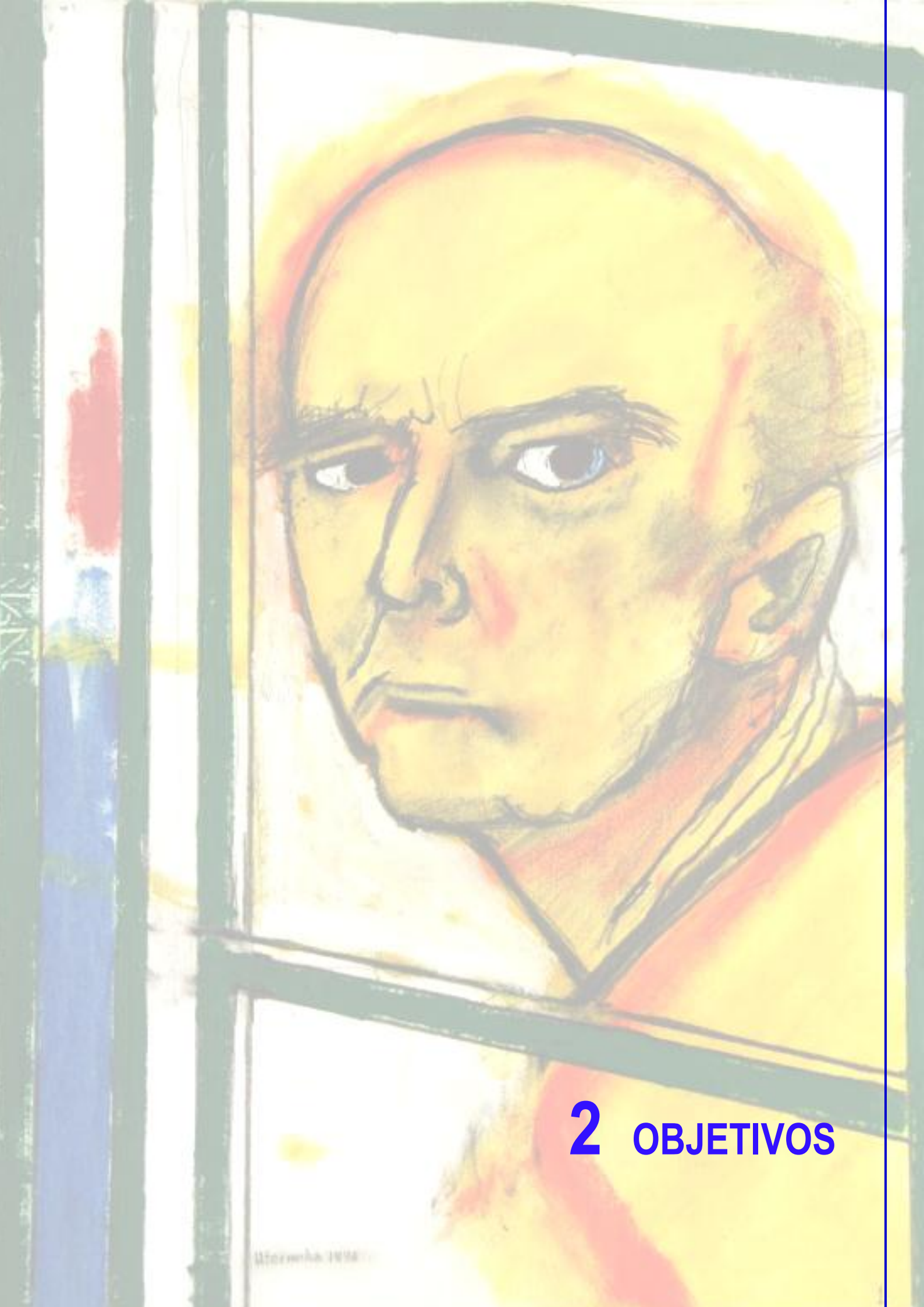
La creación de líneas de ratones transgénicos, capaces de reproducir algunas características clínicas y patológicas de la enfermedad de Alzheimer en seres humanos, representa uno de los avances más notables en la investigación de la EA, además de otras patologías neurodegenerativas. Se trata, sin duda, de una herramienta fundamental en la investigación para entender las bases moleculares de esta enfermedad y para avanzar en el diseño y ensayo de nuevas terapias de posible utilidad en seres humanos.

Los ratones transgénicos han ayudado a clarificar la acumulación de A β y su acción perjudicial. El aumento de los niveles de A β y el desarrollo de placas seniles ha sido suficiente para inducir déficits cognitivos y disfunción sináptica, a pesar de la ausencia de ovillos neurofibrilares, sirviendo de apoyo a la explicación de la “hipótesis amiloide” que indica que la acumulación del péptido A β podría ser la primera culpable en la acción neurotóxica observada en la EA (Kokjohn & Roher, 2009). Esta hipótesis se ha mantenido invariable a lo largo de los años en términos de la secuencia de eventos que conducen a la muerte neuronal, pero existen apoyos experimentales que demuestran que los oligómeros de A β solubles son los principales responsables de la disfunción cognitiva y sináptica (Hardy & Selkoe, 2002). Esto se debió, en parte, a la falta de correlación entre el número de placas de A β y el grado de demencia en seres humanos, pero con la existencia de una fuerte correlación con especies solubles de A β de bajo peso molecular (Funato et al., 1999; Lue et al., 1999; McLean et al., 1999; Klein et al., 2001). Estas observaciones fueron apoyadas por los modelos de ratón en el que los déficits cognitivos y la disfunción sináptica se hacen perceptibles antes de la aparición de placas, aunque varios grupos han descrito el deterioro cognitivo con la aparición de éstas (Chen et al., 2000; Janus et al., 2000; Gordon et al., 2001).

Sin embargo, a pesar de su utilidad, los ratones transgénicos todavía sufren varias limitaciones debido a que son capaces de reproducir parcialmente la EA humana (Bales, 2012). Además, la pregunta que surge es si estos ratones realmente reflejan el perfil neuropatológico de la EA humana o si podrían ser simplemente un artefacto de la investigación biomédica (Balducci & Forloni, 2011). Los ratones transgénicos para el gen *APP* humano producen una sobreexpresión entre 5 y 10 veces de éste debido al uso de diferentes promotores; y con la presencia de mutaciones, incluso en varios genes, se consigue un aumento entre 5 y 12 veces de A β , con lo que es posible inducir patología amiloide (Balducci & Forloni, 2011). Esto posiblemente conduce a un proceso artificial que no refleja plenamente la situación humana, debido a que, sobre todo, no han sido descritas tantas mutaciones simultáneas en varios genes (*APP*, *PS1* y *TAU*) en humanos. De hecho,

en humanos un aumento del 50% (1.5 veces) en la expresión del gen *APP* es suficiente para desarrollar placas amiloides como ocurre, por ejemplo, en el síndrome de Down debido a la trisomía del cromosoma 21 (Duff & Suleman, 2004). Ninguno de los ratones transgénicos que sobreexpresa el gen *APP* humano en ausencia de mutaciones ligadas a la EAF, ha sido capaz de desarrollar una importante patología amiloide. Y además, en ninguno de los ratones transgénicos generados, a diferencia de lo que sucede en los cerebros de humanos con EA, se ha descrito muerte neuronal a gran escala. Los ratones transgénicos reproducen las características de EA vinculadas a la presencia de mutaciones humanas que inducen la infrecuente forma familiar de la EA, representando sólo el 1% de los todos los casos de EA (Blennow et al., 2006), en lugar de la forma más prevalente de la enfermedad, la esporádica, que a pesar de que es indistinguible de la EAF en términos de fenotipo patológico, no involucra a las mutaciones genéticas. Por lo tanto, los ratones transgénicos generados se encuentran más cerca de reproducir lo que ocurre en la EAF, estando pendiente de descubrir los factores que conducen a la acumulación de A β y agregación en la EAE.

A pesar de sus limitaciones, los ratones transgénicos siguen siendo la herramienta científica más importante para la investigación en los eventos neuropatológicos de la EA. Es tarea de la comunidad científica la generación de un modelo animal que permita mimetizar la situación de los pacientes de la enfermedad esporádica, en el que se consiga una correcta expresión del gen *APP* humano, evitando su sobreexpresión y la presencia de mutaciones que estuviesen asociadas a la variante familiar de la enfermedad. Sobre dicho modelo, debería estudiarse la posible implicación de los factores considerados de riesgo para el desarrollo de la enfermedad esporádica (envejecimiento, estrés oxidativo, infecciones, etc.) como paso imprescindible para lograr la comprensión de su etiología y, finalmente, el desarrollo de una terapia para combatirla.



2 OBJETIVOS

1996. Autorretrato de William Utermohlen (Amarillo y Verde)

Galería Beckel Odille Boïcos, Paris

Primer autorretrato realizado por William Utermohlen una vez diagnosticado de la enfermedad de Alzheimer. Según su esposa Patricia, profesora de arte, en este retrato William da testimonio de su experiencia de vivir con la enfermedad: el mundo se ha reducido y se asoma a él enojado como si estuviera atrapado detrás de las rejas de una prisión.

Hasta la fecha se han generado multitud de modelos animales para el estudio de la EA, centrándose, sobre todo, en la variante familiar de la enfermedad. Estos modelos han permitido conocer la relación existente entre determinados genes y la enfermedad, mediante la creación de animales transgénicos portadores de mutaciones en los genes implicados, incluso, con la creación de dobles y triples transgénicos. Sin embargo, estos modelos presentan una serie de limitaciones que impiden usarlos como base experimental para la variante esporádica de la EA, la causante de aproximadamente el 99% de casos de EA.

El objetivo principal de este trabajo consiste en la generación de dos ratones transgénicos, capaces de expresar el gen *APP* humano correctamente, tanto en su variedad silvestre como en su variedad mutada, incorporando en su genoma el locus completo del gen *APP* humano y conservando todas las secuencias reguladoras del mismo, de tal forma que ambos animales podrían ser utilizados como modelos de la EA en su variedad esporádica y en su variedad familiar.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. Obtención del YAC APPwt (YAC portador del locus del gen APP silvestre). Modificando, mediante recombinación homóloga en levaduras, un YAC portador del locus *APP* humano para la eliminación del gen que codifica para el factor de transcripción GABPA, situado en la posición 3' respecto al gen *APP* en dicho YAC.

2. Obtención del YAC APPswe (YAC portador del locus del gen APP con la mutación “Sueca”). Generación, mediante mutagénesis dirigida y posterior recombinación homóloga, del YAC portador del locus *APP* humano con la mutación “Sueca” (K670N/M671L).

3. Generación de dos ratones transgénicos. Creación, mediante técnicas de transgénesis, de un ratón que incorpore en su genoma el YAC APPwt, como modelo de la EAE; y otro que incorpore el YAC APPswe, como modelo de la EAF.

4. Obtención de una expresión correcta del gen APP humano en ambos modelos. Obtención, tanto a nivel de ARNm como de proteína, de una expresión de este gen de forma que sea posible su utilización como modelo de la enfermedad, y en el que pueda investigarse la etiología de ésta y ensayarse las consecuencias de distintos factores con el fin de averiguar las causas de la enfermedad y combatirlas eficazmente.



3 MATERIALES Y MÉTODOS

1997. Autorretrato de William Utermohlen (Con Sierra)

Galería Beckel Odille Boïcos, Paris

En 1997 William se entera de que sólo mediante la autopsia de su cerebro se puede diagnosticar definitivamente la enfermedad de Alzheimer. Esta idea le obsesiona, habla constantemente sobre ello con las personas de su entorno. La sierra es una alusión a este hecho, y mediante ella pretende dejar constancia de su consentimiento para que su cerebro sea analizado tras su muerte.

3.1 VECTORES DE CLONAJE

3.1.1 PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Además de las secuencias de interés, estos plásmidos contienen, como característica común a todos ellos, los elementos típicos para su manipulación en bacterias, como son un origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina (amp^R). Los principales plásmidos utilizados en este trabajo han sido los siguientes:

3.1.1.1 pRV1

El plásmido pRV1 (Srivastava & Schlessinger, 1991) fue diseñado para incorporar en el brazo de un YAC el gen que codifica resistencia a neomicina (*neo*). Contiene el gen *lys2* (codifica para α -aminoadipato reductasa), como gen de selección auxotrófico; y el gen *neo* (codifica para la enzima aminoglucósido 3'-fosfotransferasa, APH 3' II) bajo el control del promotor del gen de la proteína metalotioneína-I (MT-1) de ratón para la subsiguiente selección después de la transfección en células de mamífero. Ambos genes se encuentran flanqueados en el plásmido por fragmentos del gen *ura3* (codifica para orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), siendo así capaz de integrarse en el brazo del YAC por recombinación homóloga en levadura, interrumpiendo la secuencia del gen *ura3* de éste.

3.1.1.2 pYAC4

El plásmido pYAC4 fue generado para la construcción de librerías genómicas en YACs (Burke & Olson, 1991; Burke et al., 1992; Kuhn & Ludwig, 1994). Contiene los dos brazos con los que cuenta un YAC, divididos por una diana para la enzima *EcoR* I, sitio en el que se clonan los ADNs genómicos de las genotecas. Estos brazos contienen las secuencias esenciales para la individualidad cromosómica: dos elementos teloméricos de *Tetrahymena sp.*, uno en cada brazo, que le otorga al YAC la estabilidad estructural; un centrómero, encargado de la correcta segregación cromosómica; y una secuencia de replicación autónoma (ARS). Además, un brazo contiene el gen de selección auxotrófico *ura3*, mientras que el otro brazo tiene el gen de selección auxotrófico *trp1* [codifica para N-(5'-fosforibosil)-antranilato isomerasa].

3.1.1.3 YDp-L

YDp-L pertenece a la familia de los plásmidos YDp (Berben et al., 1991). Se trata de una familia de plásmidos, derivados del pUC9, que contienen los diferentes genes de selección auxotróficos para levaduras. YDp-L contiene el gen de selección auxotrófico *leu2* (codifica para β -

isopropilmalato deshidrogenasa) flanqueado por una secuencia portadora de múltiples sitios de clonaje, permitiendo así su extracción del vector y posterior clonaje en otro vector de interés.

3.1.1.4 pRS306

pRS306 pertenece a la familia de los plásmidos pRS300 (Sikorski & Hieter, 1989). Se trata de una familia de plásmidos, derivados del pBLUESCRIPT, que contienen los diferentes genes de selección auxotróficos para levaduras y una secuencia portadora de múltiples sitios de clonaje que permite la inclusión y manipulación de ADN (secuenciación, mutagénesis, etc.) en el propio vector que va a ser utilizado para su posterior introducción en levaduras. pRS306 contiene el gen de selección auxotrófico *ura3*.

3.1.2 GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS

3.1.2.1 Herramientas bioinformáticas

Para el análisis de alineamiento y homología de secuencias se utilizaron los programas:

- *RepeatMasker* (Tarailo-Graovac & Chen, 2009): <http://www.repeatmasker.org/>
- *MacVector* (MacVector, Inc., Cary, NC, USA) (Olson, 1994).
- *VISTA* (Mayor et al., 2000): <http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>
- *ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment*: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Para el análisis de mapas de restricción y edición de secuencias, así como dibujo de plásmidos y esquemas de secuencias, se utilizaron los programas:

- *BioEdit*: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- *pDRAW32*: <http://www.acaclone.com/>

Las secuencias de ADN correspondientes al locus genómico de *APP* en humano y en ratón fueron obtenidos de *Ensembl*: <http://www.ensembl.org/index.html> (ENSG00000142192 y ENSMUSG00000022892 respectivamente) y de *UCSC Genome Browser*: <http://genome.ucsc.edu/>. Los análisis genómicos incluidos en esta tesis corresponden a secuencias obtenidas de la versión de Febrero de 2009 para humano (GRCh37/hg19) y la versión de Julio 2007 para ratón (NCBI37/mm9).

Para el diseño de cebadores específicos se utilizaron los programas:

- *Primer3*: <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3> www.cgi
- *Primer-BLAST*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

3.1.2.2 Clonajes generales

Los clonajes generales para este trabajo se prepararon mediante los procedimientos habituales de biología molecular (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999) y protocolos del laboratorio (Montoliu, 1997). Las enzimas necesarias (enzimas de restricción, T4 ADN ligasa, fosfatasa alcalina y fragmento *Klenow* de la polimerasa) se obtuvieron de las casas comerciales Roche y New England Biolabs, utilizándose según las indicaciones específicas de la casa comercial para cada reactivo.

3.1.2.3 Electroforesis de ADN

La separación, identificación y estimación de plásmidos y fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (*UltraPure™ Agarose*, Invitrogen) a concentraciones entre 0.6–2%, permitiendo separar un rango de moléculas de ADN lineal entre 20 kb y 100 pb. Los geles se realizaron en tampón TAE 1X [Tris-Acetato 40mM, Ácido Etilen-Diamino-Tetracético (EDTA) 2mM pH 8 (Merck)], con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (BrEt) (Sigma). Se utilizaron cubetas horizontales de 6x8 cm y 11x15 cm (Ecogen) en las que, posteriormente, se aplicó una diferencia de potencial de 5 V/cm. Como patrones de peso molecular se emplearon los marcadores *1 kb Plus DNA ladder* (Invitrogen) (rango de bandas de peso molecular entre 100 y 12000 pb) y *25 bp DNA ladder* (Invitrogen) (rango de bandas de bajo peso molecular entre 25 y 500 pb y una banda adicional de 2652 pb).

3.1.2.4 Reacción de amplificación en cadena de la ADN Polimerasa (PCR)

La obtención de fragmentos específicos de ADN en cantidades necesarias para la construcción de plásmidos, comprobación de algunos clonajes y amplificaciones de regiones concretas del YAC, tanto para el análisis de las recombinaciones en levaduras como para la comprobación de la integración del mismo en los ratones transgénicos, fue llevada a cabo mediante la técnica de amplificación en cadena de la ADN polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*); que consiste en la amplificación cíclica de una región de ADN, localizada entre dos cebadores específicos, utilizando la enzima ADN polimerasa termoestable de *Thermophilus aquaticus* (Saiki et al., 1988).

La PCR requiere condiciones específicas de concentración de reactivos, temperatura, tiempos de amplificación y ciclos para cada fragmento amplificado. Sin embargo, existen unas condiciones estándares para todas las reacciones: 1.5mM MgCl₂, 200µM desoxinucleótidos trifosfato [dATP, dCTP, dTTP y dGTP (Roche)], pareja de cebadores específicos a una concentración de 0.5µM

(Sigma-Aldrich), tampón de reacción 1X (Biotools) y 1 Unidad (U) de Taq ADN polimerasa (Biotools) en un volumen final de 25 µl. La reacción se lleva a cabo en tubos de 0.2 ml (Bio-Rad) en el termociclador MJ Mini (Bio-Rad). El programa se ajusta a cada situación de amplificación, pero por lo general consta de un primer paso de desnaturalización de ADN de 5 minutos a 95°C; 35-40 ciclos de amplificación con una desnaturalización (30 segundos, 95°C), un apareamiento (30 segundos, 55-65°C) y una extensión (1-2 minutos, 72°C); y un último paso de 10 minutos a 72°C para la completa extensión de los fragmentos.

3.1.2.5 Extracción y purificación de ADN de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN, menores de 10 kb, obtenidos por PCR y/o restricción de plásmidos recombinantes, se separaron en electroforesis de agarosa en tampón TAE 1X. Posteriormente se procedió a su identificación en el gel mediante el uso de un transiluminador de luz UV de longitud de onda larga (365 nm). Se recortó la banda con una cuchilla estéril y se introdujo en un tubo de 1.5 ml (Eppendorf®). Finalmente, la purificación de estos fragmentos, embebidos en la matriz de agarosa, se llevó a cabo mediante el kit *“Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit”* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

3.1.2.6 Cuantificación de ADN

La estimación de la concentración y pureza de ADN en las muestras fue llevada a cabo en el espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific), basado en la medida espectrofotométrica de la absorbancia del ADN a longitud de onda de 260 nm para estimar su concentración, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica a dicha longitud corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena. También tiene en cuenta la medida espectrofotométrica de la absorbancia de proteínas o fenol que absorben a 280 nm y de otros contaminantes, que absorben a 230 nm, para estimar la pureza del ADN. El límite de detección mínimo y máximo de ADN de doble cadena para este espectrofotómetro es de 2 y 3700 ng/µl respectivamente.

3.1.2.7 Cepas bacterianas y medios de cultivo

La propagación de plásmidos recombinantes se llevó a cabo gracias a la cepa bacteriana de *E.coli* TOP10 (Invitrogen).

El crecimiento de las bacterias portadoras de plásmidos, que contenían el gen *amp^R*, se hizo en medio LB líquido (Luria-Bertani) en presencia de ampicilina (Sigma) a una concentración de 50

µg/ml (Sambrook et al., 1989), a 37°C, con agitación constante a 250 rpm, durante un mínimo de 8 horas.

El crecimiento de colonias recombinantes en medio sólido se hizo en placas *Petri* de 10 cm Ø (Sterilin) con medio LB con agar a una concentración de 15 g/l y ampicilina a 50 µg/ml.

3.1.2.8 Preparación y transformación de bacterias competentes

La preparación de bacterias competentes TOP10 se realizó en el laboratorio siguiendo el método de electrocompetencia recomendado por Invitrogen. Las bacterias, crecidas a partir de un clon único de estriado de células, se incuban en agitación a 37°C durante 12 horas. Este precultivo se amplía a 500 ml de LB, dejando las células crecer hasta una densidad óptica, OD₆₀₀, de 0.5-0.6. Las células se concentran por centrifugación a 2000 x g, 15 minutos a 4°C. Se lavan primero con 500 ml de agua purificada estéril a 4°C y a continuación dos lavados con 500 ml de glicerol 10% a 4°C. Se concentran de nuevo las células por centrifugación a 4000 x g, 15 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en su propio volumen, hasta que quede totalmente homogéneo. Por último, se hacen alícuotas de 40 µl, se congelan rápidamente en nitrógeno líquido (Air Liquide) y se almacenan a -80°C.

Las bacterias electrocompetentes TOP10 fueron transformadas por electroporación, añadiendo a cada alícuota del orden de pg a ng de ADN en un volumen no mayor de 1.5 µl. Se realizó en cubetas de electroporación con una separación entre electrodos de 2 mm (Bio-Rad), previamente enfriadas en hielo, y dando un pulso eléctrico en condiciones de 25 µF, 2.5 kV y 200 Ω utilizando el *MicroPulser* (Bio-Rad) según las indicaciones de la casa comercial. Una vez dado el pulso, se añade 1 ml de medio LB y se incuban a 37°C y agitación suave durante 1 hora. Finalmente se plaquean 100 y 900 µl de éstas células en dos placas de LB con agar y ampicilina. Éste método se utilizó para obtener mejores eficiencias de transformación que con el método químico cuando se trabaja en condiciones limitantes de ADN en algunas ligaciones.

Para la transformación mediante choque térmico se utilizó el kit comercial *OneShot® TOP10 Chemically competent E.coli* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial.

3.1.2.9 Purificación de ADN plasmídico

Las preparaciones de ADN plasmídico a pequeña escala (2 ml de medio de cultivo) se realizaron con el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega). Las preparaciones de ADN plasmídico a mayor escala (≤ 500 ml de medio de cultivo) se llevaron a cabo

con el *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen). Para ambas purificaciones se siguieron los protocolos de cada casa comercial.

3.1.2.10 Secuenciación de ADN

Las secuencias se obtuvieron de los servicios de secuenciación del Parque Científico de Madrid (PCM-UAM, Madrid) y de Macrogen (Seúl, Corea del Sur) (http://www.macrogen.com/eng/sequencing/sequence_main.jsp).

3.1.2.11 Mutagénesis dirigida

El plásmido mutante se obtuvo mediante mutagénesis dirigida usando el kit comercial *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

3.2 CEBADORES

3.2.1 YAC

Se diseñaron una serie de cebadores para el análisis de los plásmidos generados, de los clones de levaduras recombinantes, para la identificación de ratones transgénicos portadores del YAC, a lo largo de toda su longitud (los dos brazos, la región codificante del gen *APP* y las regiones 5' y 3' que flanquean dicho gen) y para la generación de sondas para el análisis mediante *Southern blot*.

3.2.1.1 Brazos del YAC

Los cebadores utilizados para la detección de secuencias propias de los brazos de los diferentes YACs se muestran a continuación en la **Tabla MM.1**:

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')
trp1 F trp1 R	GCCCAATAGAAAGAGAACAATTGACC ACACCTCCGCTTACATCAACACC
lys2 F lys2 R	ACCAAGCCAGCATCTGTATCACC GCCAAATCCATCCACTTCTCATC
ura3 F ura3 R	GCCCAGTATTCTTAACCCAACTGCA CTTCCACCCATGTCTCTTGAGCAA
leu2 F leu2 R	ATTGATTGATTCTGCCGCCATGATCC CAAGATAGTGGCGATAGGGTTGACC
neo F neo R	GCTATTCGGCTATGACTGGG GAAGGCGATAGAAGGCGATG
uraArm F uraArm R	CGACTCCTGCATTAGGAAGC CCTATATCGCCGACATCACC
trpArm F trpArm R	TCTTGCGCCTTAAACCAACT TATCGACTACGCGATCATGG

Tabla MM.1. Cebadores utilizados para la detección de secuencias propias de los brazos en los diferentes YACs. Se indica el nombre para cada cebador, representando el cebador directo como F (*Forward*) y el inverso como R (*Reverse*), y la secuencia de nucleótidos para ambos cebadores en dirección 5' → 3'.

3.2.1.2 Región 5'

Los cebadores usados para la delimitación y análisis del YAC en la región 5' que flanquea el gen *APP*, y su distancia en pb (inicio y fin) hasta la posición 27,543,446 del cromosoma 21 humano (GRCh37/hg19), lugar de inicio de la transcripción del gen *APP*, se muestran en la **Tabla MM.2**:

NOMBRE	SECUENCIA (5'→ 3')	INICIO	FIN
Sec1A F	CCAGTTGTTCTATGCAGCAAAA	-29251	-29230
Sec1A R	TATCCAAACCCCTTCCCATT	-28782	-28763
Sec1 F	GGGGAATGGAAGTGGTACA	-64497	-64478
Sec1 R	CCGCTTATCACAGCTTGGTT	-64010	-63991
Sec2B F	GCAGTGAACTGCATGGCTA	-83979	-83960
Sec2B R	TTAATGTGGGGGCAAAGAAC	-83640	-83621
Sec2A F	TAGAGAGTGCCCCCTTTTCC	-101011	-100992
Sec2A R	CCACTCAAATCCTTCTCCTG	-100300	-100280
Sec2 F	GTCATTTCAGAAAAAGCCCACTGC	-108029	-108005
Sec2 R	TGGGGAGAGGAATGGAATTTGGA	-106581	-106559
Sec3 F	CTTCCTCCTGTGGAGTCTGC	-135054	-135035
Sec3 R	TACAGGAAGCCATGGGAAAG	-134848	-134829
Sec4 F	CTCTGTTGCAGGTCCAGTGA	-154747	-154728
Sec4 R	CATCTTTCTCCTGGGACGAG	-154563	-154544
Sec5.4 F	ATGGGCTGAATTGTGAGACC	-158635	-158616
Sec5.4 R	TAAATGCCCTTTTCCCTGTG	-158423	-158404
Sec5.3 F	CTGAGAGGGTCCAGAGATGC	-162519	-162500
Sec5.3 R	GCTGATTGAAGAGCCTTTGG	-162291	-162272
Sec5.2 F	TGATCCACTCGTCATTCAAGG	-166695	-166676
Sec5.2 R	CCGTATGCTGGATCACAAA	-166544	-166525
Sec5.1 F	TGTATCCACCACCTCAAGCA	-170420	-170401
Sec5.1 R	TTTCACATGTTTGTGGCTGA	-170246	-170226
Sec5 F	TTCTGCAAGCACATGGAAAG	-174838	-174819
Sec5 R	GGGCAACAGCTCTTAATGGA	-174704	-174685

Tabla MM.2. Cebadores utilizados para la delimitación y análisis de los diferentes YACs en la región 5' que flanquea el gen *APP*. Se indica el nombre para cada cebador, representando el cebador directo como F (*Forward*) y el inverso como R (*Reverse*), la secuencia de nucleótidos para ambos cebadores en dirección 5' → 3', y la distancia hasta el inicio del gen *APP*.

3.2.1.3 Gen *APP* humano

Los cebadores usados para el análisis del promotor y los diferentes exones del gen *APP* humano, y su distancia en pb (inicio y fin) hasta la posición 27,543,446 del cromosoma 21 humano (GRCh37/hg19), lugar de inicio de la transcripción del gen *APP*, se muestran en la **Tabla MM.3**:

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	INICIO	FIN
PromotorAPP F	TGCAGAGGAAAGAACGTGTG	-3976	-3957
PromotorAPP R	TGGATGGATCAAACACCAGA	-3163	-3144
Exon1APP F	GATCCCACTCGCACAGCAG	462	480
Exon1APP R	TCTGCATTAAAGACTTGGGTAAAGG	628	652
Exon2APP F	AAGACCGGGCTGATTCCTAA	58854	58873
Exon2APP R	TCCAACGTGAATTGCTAGCC	59167	59186
Exon3APP F	CCCAAGCATTTTGGATAAGG	80939	80958
Exon3APP R	CCTCTTTTTCTTCCCTCAAG	81232	81251
Exon4APP F	TTGATTGGGTTGCTTAGGCA	117653	117672
Exon4APP R	TGTTGCCTCAAAATACCCCT	117963	117982
Exon5APP F	CTACCACTCACTGTTTTCTC	119903	119922
Exon5APP R	GCAGAGACCTTTTCAGTGAT	120216	120235
Exon6APP F	TGCCAAAATTCCATATGGACG	149000	149020
Exon6APP R	GGGATTTGCCAAGCAGCATAT	149508	149528
Exon7APP F	CCACTGGGAGGATTAAGA	170853	170872
Exon7APP R	GAGAAGTGGACAGAAATGTG	171233	171252
Exon8APP F	TTGTCAGTGGACTCGTGCAT	173632	173651
Exon8APP R	CATCTCAAGCTGTCTGGCAA	173934	173953
Exon9APP F	TCTTTGCATGCTTGTTCGT	188370	188389
Exon9APP R	ATGTTACGGAGGATGCAA	188949	188967
Exon10APP F	CAGATAGGAAGGGGTATGTA	194963	194982
Exon10APP R	GGAGCAAATATAAGGCAGGA	195342	195361
Exon11APP F	TGATGAGGGTTGGAGAGTGCA	195706	195726
Exon11APP R	CAAGATGGAATGGACAGGGGT	196193	196213
Exon12-13APP F	GCCTCGTCACGTGTTCAATA	215376	215395
Exon12-13APP R	CCATGTGCAGCATCAAAGA	216556	216575
Exon14APP F	GCACGTGAAAGCAGTTGAAG	259062	259081
Exon14APP R	TTGCCACCTATACAATGGAG	259661	259680
Exon15APP F	CTGGCACATCAATAGCGATA	265843	265862
Exon15APP R	ACTCGGAACCTGGGAAATGA	266282	266301
Exon16APP F	TAAAGGCAGCAGAAGCCTTA	273222	273241
Exon16APP R	GCTCAGCCTAGCCTATTTAT	273709	273728
Exon17APP F	ACCAGTTGGGCAGAGAATAT	279113	279132
Exon17APP R	CTTGAGCAGAATATTCACGG	279588	279607
Exon18APP F	TCAGCTCTCCTCTTGTTCAT	289341	289362
Exon18APP R	ACAGCACAGCTGTCAAAGG	289586	289605

Tabla MM.3. Cebadores utilizados para el análisis del promotor y diferentes exones del gen *APP*. Se indica el nombre para cada cebador, representando el cebador directo como F (*Forward*) y el inverso como R (*Reverse*), la secuencia de nucleótidos para ambos cebadores en dirección 5' → 3', y la distancia hasta el inicio del gen *APP*.

3.2.1.4 Región 3'

Los cebadores usados para delimitación y análisis del YAC, en la región 3' que flanquea el gen *APP*, además del gen *GABPA*, y su distancia en pb (inicio y fin) hasta la posición 27,543,446 del cromosoma 21 humano (GRCh37/hg19), lugar de inicio de la transcripción del gen *APP* se muestran en la **Tabla MM.4**:

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	INICIO	FIN
SecA' F	AAGGCTCCTCTGCTGTTTGA	324053	324072
SecA' R	CTCATGCCCCTTGTCAGTCT	324425	324444
SecA F	TGAAATGTCCCCACACTGATCACTG	379659	379683
SecA R	CCAGCATGTTTTCCAAAGTATGAG	381110	381133
SecB F	GGGAGAACAAACATACCTCACTAGC	398096	398120
SecB R	ATCCTAAGAGGCAGGGATCTTAAGG	400359	400383
GABPA F	GTAAAGCAACATCTAAAGCA	401481	401500
GABPA R	TATTATTACGATGGGGACAT	402111	402130
SecC F	GGTCCGCTAACCTGATCAAA	434910	434929
SecC R	TGGTAGCCATCTGGGTTTGT	435048	435067
SecC.1 F	GTGGATTTTACCCGTGTTGC	437247	437266
SecC.1 R	GCAATAGGTTACCCGACAT	437464	437483
SecC.2 F	CAGCTTGGTGAAGAACAACCA	438937	438956
SecC.2 R	AGGAGTGGGTGTGAGAATGG	439099	439118
SecC.3 F	CCTCACCTCACATTTTGTGC	441071	441090
SecC.3 R	CCGAATGACAGAGGAGAACC	441363	441382
SecC.4 F	ATTGCCAAACTGAGGAGGA	443161	443180
SecC.4 R	CAAATTCCCTGACGAGTCC	443349	443368
SecD F	AAGCCATTTAGTGATGGCTGA	444931	444951
SecD R	CAGCAACTGCGTAAACCTGA	445102	445121

Tabla MM.4. Cebadores utilizados para la delimitación y análisis de los diferentes YACs en la región 3' que flanquea el gen *APP*. Se indica el nombre para cada cebador, representando el cebador directo como F (*Forward*) y el inverso como R (*Reverse*), la secuencia de nucleótidos para ambos cebadores en dirección 5' → 3', y la distancia en pb hasta el inicio del gen *APP*.

3.2.1.5 Sondas

Una amplia mayoría de los cebadores mencionados a lo largo del YAC nos sirvieron para la generación de las sondas, derivadas de los productos de PCR resultantes, que fueron utilizadas en el análisis mediante *Southern blot*. Adicionalmente se utilizaron los siguientes cebadores:

Alu F 5' GGATCACGAGGTCAGGAGAT 3'
Alu R 5' ACGGAGTCTCGCTCTGTCG 3'

3.2.2 SEXO Y PLOIDÍA DE LEVADURAS

Los cebadores utilizados para comprobar el sexo y la ploidía de las levaduras, en el paso de transferencia del YAC, han sido los siguientes:

MAT1	5' AGTCACATCAAGATCGTTTATGG 3'
MAT2	5' GCACGGAATATGGGACTACTTCG 3'
MAT3	5' ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG 3'

3.2.3 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Los cebadores utilizados para la generación del plásmido mutante, portador de la mutación “Sueca” del gen *APP* (K670N/M671L) (marcado en rojo en el cebador) (Mullan et al., 1992), fueron los siguientes:

genomicAPP16 F	5' CGGGATCCTCGTAGGTTATAAATTCTGTTAGTTGC 3'
genomicAPP16 R	5' CCCAAGCTTCTATTTATTTTCTTCATGTTTTTCATGG 3'
mutAPPswe F	5' GAGGAGATCTCTGAAGTGAATCTGGATGCAGAATTC 3'
mutAPPswe R	5' TTCATTTCAGAGATCTCCTCCGTCTTGATATTTG 3'

3.2.4 PCR CUANTITATIVA (qPCR)

Los cebadores usados para la cuantificación del número de copias del transgén en el ratón, mediante la técnica de PCR cuantitativa, fueron los siguientes:

qPCR-hAPP F	5' GCTCCTGCTTGATTTGCTTTCT 3'
qPCR-hAPP R	5' ACACCACTACGCTTCCTTCTTTTC 3'
qPCR-profilin1 F	5' CAACTCCAGCTCCACAGTACA 3'
qPCR-profilin1 R	5' TCTTTGCCTACCAGGACACC 3'

3.2.5 ANÁLISIS ISOFORMAS APP

Los cebadores usados para la detección de las diferentes isoformas de APP humano y App murino fueron los siguientes:

Isoformas-App-ratón F	5' GTAGTAGAAGTCGCCGAAGAGG 3'
Isoformas-App-ratón R	5' GTGCTGGCTGCTGTCGTG 3'
Isoformas-APP-humano F	5' CGATGATGACGAGGACGAT 3'
Isoformas-APP-humano R	5' TTCATTCTCATCCCCAGGTG 3'

3.3 MODIFICACIONES DE YACs

3.3.1 CEPAS DE LEVADURA Y MEDIOS DE CULTIVO

El clon original B142F9 fue cedido amablemente por el Dr. Bruce Lamb (Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA). Dicho clon contiene el YAC APP-8, descrito con un tamaño aproximado de 650 kb, que incluye el gen *APP* completo (Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993; Lamb et al., 1997). Este YAC se encuentra en la cepa de *S.cerevisiae* AB1380 haploide, cuyo genotipo es: *MATa*, *ura3-52*, *trp1*, *ade2-1*, *lys2-1*, *his5*, *can1-100*. Posteriormente se transfirió el YAC APP-8 a una nueva cepa de *S.cerevisiae* haploide, llamada YLBW4, cedida amablemente por la Dra. Lisbeth Hamer (Universidad de Carolina del Norte, NC, USA). Esta cepa pertenece a la familia de las levaduras *windows*, llamadas así porque dejan un espacio amplio entre cromosomas endógenos para la visualización del YAC, evitando así la contaminación por cromosomas endógenos en los pasos de purificación futuros de dicho YAC (Hamer et al., 1995). El genotipo de esta cepa es: *MATα*, *leu2-Δ1*, *trp1-Δ63*, *ura3-52*, *ade2-101*, *his3-Δ200*, *lys2-801*, *cyh2^R*, *kar1-Δ15*, *thr1*.

Las levaduras tanto de la cepa AB1380 como de la cepa YLBW4 portadoras de YAC fueron crecidas en medio líquido y sólido con selectores auxotróficos para evitar la eliminación espontánea del YAC. Los medios selectivos se prepararon con D(+)-Glucosa 2% (Merck), YNB (*Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids*) 0.65% (Difco) y los aminoácidos correspondientes (Serva), sin incorporar los necesarios para la selección en cada caso. En el caso de los medios sólidos, las placas se prepararon con 2% de agar.

Adicionalmente, para la selección de colonias tras la transformación, se usaron placas que contenían, además del medio selectivo necesario en cada caso, D(-)-Sorbitol 1M (Serva). Para la selección de cepas de levadura YLBW4 que habían incorporado el YAC, se añadió también cicloheximida (Cyh) (Sigma) a una concentración final de 3 µg/ml. Para la selección de los mutantes *ura3*, además del medio necesario y sorbitol, se añadió a las placas ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) (Sigma) a una concentración final de 1 mg/ml.

Las levaduras de la cepa AB1380 e YLBW4 que no contenían YAC, y por lo tanto marcadores de selección, fueron crecidas en medio líquido y sólido, y requerían el medio de crecimiento completo YPD: extracto de levadura 1% (Pronadisa), peptona 2% (Difco) y D(+)-Glucosa 2%. En el caso de los medios sólidos, las placas se prepararon al 2% de agar.

Los cultivos líquidos se crecieron durante 2-3 días, a 30°C y en agitación (250 rpm); mientras que, para la obtención de colonias en placas, fue necesario crecer las levaduras durante 4-5 días a 30°C.

3.3.2 TRANSFERENCIA DE YACS EN LEVADURAS

La transferencia del YAC a una nueva cepa se llevó a cabo por el método del *kar-crossing* (Hugerat et al., 1994; Spencer et al., 1994). El apareamiento sexual de las levaduras se produce entre células haploides de distinto sexo. En el caso de las levaduras, la determinación sexual está determinada por un locus, conocido con el nombre de *MAT*, que puede ser “a” o “α”. Durante el apareamiento se produce la conjugación, que finaliza con la fusión nuclear (cariogamia), seguida de la fusión de la pared celular para formar una célula diploide. Sin embargo, si una cepa es mutante para el gen *kar1* (no produce cariogamia), en la mayoría de los casos se produce progenie haploide por gemación desde un heterocarion, compartiendo el citoplasma parental, pero conteniendo solamente uno de los núcleos parentales. Durante este proceso, con una frecuencia de 10^{-3} - 10^{-4} , un cromosoma de un núcleo (que puede ser el YAC) se transfiere al otro.

El protocolo que se siguió para la transferencia del YAC fue el descrito por la Dra. Lisbeth Hamer (Hamer et al., 1995) que consistía en lo siguiente: se inocularon 25 ml de la levadura *window* (YLBW4), mutante para *kar1* (*kar1-Δ15*), en medio YPD y 25 ml de la levadura de la cepa AB1380 que portaba el YAC APP-8 (clon B142F9), en medio selectivo de nuestro YAC, SD –U –W (medio sin uracilo ni triptófano), y se dejaron incubando durante 12-14 horas a 30°C en agitación (250 rpm). Se determinó el número de levaduras en los dos cultivos y se inocularon 5×10^6 células de cada cultivo. Se centrifugó el cultivo mixto a 2000 x g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de medio YPD. Se resuspendieron las células y se incubaron nuevamente a 30°C durante 6 horas sin agitación. Posteriormente se sembraron en placas con el medio selectivo para nuestro YAC y cicloheximida (SD –U –W + Cyh), y se incubaron a 30°C durante 4-5 días. La Cyh es un inhibidor de la síntesis de proteínas, y por tanto, las colonias resultantes fueron aquellas que presentaban el gen de resistencia a cicloheximida (Cyh^R) (genotipo YLBW4) y además portaban el YAC, debido a que eran capaces de crecer en el medio selectivo.

Las colonias obtenidas se analizaron mediante PCR específica del locus *MAT* de levaduras (Huxley et al., 1990) para comprobar el sexo y la ploidía (*MATa*, *MATα* o *MATa/MATα*) en los clones seleccionados. El programa utilizado consta de una primera desnaturalización del ADN a 95°C, durante 5 minutos. A continuación un ciclo de 3 temperaturas, que se repetía 35 veces: 1 minuto a

95°C; 2 minutos a 58°C y 2 minutos a 72°C. Y por último, se sometían a 10 minutos a 72°C para la completa extensión de los fragmentos.

3.3.3 RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN LEVADURAS

3.3.3.1 Recombinación homóloga mediante integración y fragmentación cromosómica.

Preparación y transformación de levaduras competentes

La transformación de levaduras se llevó a cabo por el método del acetato de litio (AcLi) (Sigma). Este método fue descrito por primera vez en 1983 (Ito et al., 1983) y ha sido el más aceptado y aplicado (Markie, 1995; Adams et al., 1997; Giraldo, 2002). El primer paso consiste en la preparación de células de levadura competentes de la cepa portadora del YAC. Para ello, se crece un clon aislado de esta cepa, en medio selectivo para el YAC, hasta saturación. Se inoculan 50 µl del cultivo en 100 ml de medio selectivo y se deja creciendo hasta obtener una concentración de $2-3 \times 10^7$ células/ml. A continuación se centrifugan las células a 2000 x g, durante 3 minutos, a temperatura ambiente (TA). Se hace un paso de lavado con agua purificada estéril y se centrifuga de nuevo en las condiciones anteriores. Se resuspende el precipitado de células en 20 ml de AcLi 0.1M en TE (Tris 100mM pH 7.5, EDTA 1mM) y se incuba durante 30 minutos a 30° C. Se vuelve a centrifugar a 2000 x g, durante 3 minutos, a TA. Se resuspende el precipitado en 2.5 ml de AcLi 0.1M en TE y 2.5 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma) 10%, se mezcla suavemente y se preparan alícuotas de 200 µl. Estas alícuotas son células competentes que se pueden utilizar directamente o almacenarse a -80°C para transformaciones posteriores.

El segundo paso es el proceso de transformación en sí, en el cual se da la recombinación homóloga. Se lleva a cabo añadiendo, a cada alícuota, 20 µl de una solución que contiene alrededor de 20 µg de esperma de salmón, y 50 ng-1 µg de ADN lineal que se quiere transformar. Se mezcla suavemente el ADN con las células y se incuba a 30°C durante 30 minutos, invirtiendo el tubo aproximadamente cada 10 minutos para evitar la sedimentación de las levaduras. Se añaden 220 µl de polietilén glicol 3350 (PEG3350) (Sigma) 60% y se incuba 1 hora a 30°C, 5 minutos a 42°C y 5 minutos a TA. Se centrifugan las células a 2000 x g, durante 3 minutos, a TA y se hace un lavado con agua purificada estéril para eliminar los restos de PEG3350. Finalmente se resuspende el precipitado en 100 µl de agua purificada estéril, se plaquea en medio selectivo del nuevo YAC con 1M Sorbitol y se deja crecer a 30°C hasta la aparición de colonias (clones recombinantes).

3.3.3.2 Recombinación homóloga mediante el método *Pop-in/Pop-out*

El método de *Pop-in/Pop-out* se realizó, en líneas generales, según protocolos descritos previamente (Duff & Huxley, 1996; Giraldo et al., 1999; Giraldo, 2002). El proceso completo consta de dos etapas de transformación. La primera transformación es la conocida como *Pop-in*, y sigue el protocolo del AcLi descrito anteriormente, ya que consiste en sí en un paso de integración. La segunda transformación es la conocida como *Pop-out*, y en ella, una vez analizados los clones *Pop-in* capaces de crecer en medio selectivo SD –K–W–L–U, se seleccionaron los positivos y se procedió a este segundo paso de recombinación. Se inocularon 10 ml de medio selectivo SD –K–W–L con 50 µl del cultivo preservado a –80°C y se incubó 14-16 horas, a 30°C y 250 rpm. Al quitar la selección por uracilo se promovió la eliminación de dicho marcador por recombinación. A continuación se plaquearon distintas diluciones del cultivo (1/10, 1/100 y 1/1000) en SD –K–W–L + 5-FOA, y se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias. El 5-FOA inhibe el crecimiento de células que conserven el marcador *ura3* ya que se convierte en un producto tóxico por acción de la descarboxilasa codificada por el gen *ura3* (Adams et al., 1997; Giraldo, 2002).

3.3.4 ANÁLISIS DE CLONES RECOMBINANTES DE LEVADURA

3.3.4.1 Extracción de ADN genómico de levaduras

La extracción de ADN genómico de levaduras se realizó según protocolos descritos previamente (Giraldo, 2002). Brevemente, las colonias resultantes de la transformación se inocularon en 10 ml de medio selectivo y se dejaron crecer 2-3 días, a 30°C y con agitación, hasta alcanzar la saturación. Se separaron 465 µl para preservar los clones a –80°C en DMSO al 7%, y el resto se usaron para preparar ADN genómico. Para la extracción de ADN se centrifugó el cultivo en tubos cónicos de 15 ml (Falcon™) a 2000 x g, durante 5 minutos, a TA. Se resuspendió el precipitado celular en 1.5 ml de Sorbitol 1M. Se centrifugó en las mismas condiciones que antes y se resuspendió en 1 ml de tampón de liticasa [Sorbitol 0.9M, fosfato sódico 50mM, β-mercaptoetanol 0.1% (Sigma)]. Se transfirió todo a un tubo de 1.5 ml y se añadieron 20 µl de enzima liticasa (Sigma) a 4 mg/ml. Se dejó incubando 1 hora a 37°C en un baño con agitación (<100 rpm). Tras el periodo de incubación, se centrifugaron en las condiciones anteriores y el precipitado se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis [EDTA 50mM pH 8, y dodecil sulfato sódico (SDS) (Merck) 0.3%]. Se incubaron los tubos a 65°C durante 20-30 minutos para promover la lisis y se añadieron 100 µl de Acetato Potásico 5M (Merck) para precipitar las proteínas y restos celulares. A continuación, se incubó en hielo durante un mínimo de 30 minutos, se centrifugó a 20000 x g durante 1 minuto a 4°C y se transfirió el sobrenadante (600

μl) a un nuevo tubo. Para la precipitación del ADN, se añadió 1 ml de etanol 95% a TA y se mezcló cuidadosamente por inversión. Se centrifugó a 20000 x g durante 1 minuto a TA, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 300 μl de TE. Para la completa resuspensión del ADN, se incubó la muestra a 65°C durante 20 minutos o se dejó 14-16 horas a 4°C. Posteriormente se incubó con 1 μl de RNasa A (10 mg/ml) (Roche) a 37°C durante 30 minutos, se hizo una extracción fenólica, se precipitó el ADN añadiendo 30 μl (1/10 volumen total) de Acetato Sódico 3M (Merck) pH 5.2, y 750 μl (2.5 volúmenes del total) de etanol absoluto (100%) (Merck) y se centrifugó a 20000 x g durante 10 minutos a TA. Finalmente, se lavó con 400 μl de etanol 70%, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 150 μl de TE. Se analizaron 2 μl en un gel de electroforesis de agarosa al 1% para comprobar la calidad de la muestra, y el resto se almacenó a 4°C.

3.3.4.2 PCR

Las diferentes PCRs se realizaron en todos los clones recombinantes seleccionados. Primero se realizó una PCR directa de colonia de levadura para analizar las secuencias incorporadas/eliminadas tras la recombinación; y seguidamente con los clones ya seleccionados, se hicieron diferentes PCRs, a partir de ADN genómico extraído, para comprobar las diferentes secuencias a lo largo de toda la estructura del YAC.

3.3.4.2.1 PCR de colonias de levadura

El análisis de colonias de levadura ha sido un proceso fundamental para el estudio de las distintas recombinaciones homólogas. Debido al número elevado de clones a analizar, el poder realizar una PCR directa de las colonias, evitando el tiempo invertido en crecimiento y posterior extracción, ha permitido acelerar el proceso de análisis de dichos clones recombinantes. Para la PCR de colonias de levadura es necesario realizar un tratamiento previo a las levaduras. Se transfiere la colonia a un tubo de 0.2 ml, donde se resuspende en 50 μl de Zimoliasa 20T (MP Biomedicals) a 20 U/ml y se incuba durante 10 minutos a TA. Se centrifugan los tubos a 2000 x g, se elimina el sobrenadante y se calientan las células durante 5 minutos a 95°C. Finalmente se resuspende el precipitado en 15 μl de agua purificada estéril, y se usan 5 μl en un volumen final de reacción de 25 μl, en las condiciones de mezcla de reacción ya descritas con anterioridad en el apartado 3.1.2.4. El resultado se analizó en geles de electroforesis de agarosa.

3.3.4.2.2 PCR de ADN genómico de levadura

La PCR a partir de ADN genómico de levaduras se realizó con 1 µl de ADN (50-150 ng) en un volumen final de 25 µl y en las condiciones de mezcla de reacción ya descritas con anterioridad en el apartado 3.1.2.4. El resultado se analizó en geles de electroforesis de agarosa.

3.3.4.3 Análisis mediante hibridación ADN-ADN (*Southern blot*)

Para el análisis mediante *Southern blot* (Southern, 1975) de los clones seleccionados, se digirieron entre 2-4 µg de ADN genómico de levadura con 40 U de la enzima de restricción correspondiente, en tampón 1X y espermidina 4mM. Se incubó la mezcla de digestión durante 12-14 horas a la temperatura de corte de la enzima. Los productos de digestión se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X, en cubetas horizontales Horizon® (20 x 25 cm) (Life Technologies), con una diferencia de potencial de 5 V/cm durante 3-6 horas. Como patrones de peso molecular se empleó el *1 kb DNA ladder* (Invitrogen) marcado radiactivamente.

Una vez realizada la electroforesis los geles se incubaron 15 minutos en HCl 0.25N (Merck) para despurinizar el ADN y 2 x 15 minutos en NaOH 0.4M (Merck) para la neutralización y desnaturalización del ADN. Se transfirieron a una membrana de nylon *Amersham Hybond™-N* (GE Healthcare) mediante capilaridad, durante 14-16 horas en tampón de transferencia SSC 20X [NaCl 3M (Merck), Citrato Sódico 0.3M (Calbiochem)]. El ADN se fijó a la membrana mediante luz de onda corta ultravioleta (254 nm) con dos pulsos de 70 mJ/cm² con el CL-1000 *Ultraviolet Crooslinker* (UVP-Stratagen).

Como sonda para la hibridación, se utilizaron fragmentos de ADN obtenidos por restricción enzimática de plásmidos o mediante PCR; y posteriormente purificados a partir de geles de agarosa, o directamente de productos de PCR utilizando el *QIAquick® PCR Purification kit* (Qiagen). A continuación se marcan radioactivamente 50 ng de sonda purificada con 30 µCi de dCTP [α -³²P] (Perkin-Elmer) usando el kit *High Prime* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La purificación de los fragmentos marcados se realizó con las columnas *ProbeQuant™ G-50* (GE Healthcare). Todas las hibridaciones se realizaron a 65°C durante 14-16 horas, siguiendo protocolos descritos (Montoliu, 1997; Giraldo, 2002). La exposición de los filtros se llevó a cabo en *cassettes* de exposición Bio-Rad, durante 1-2 días a TA; se escanea en el *Molecular Imager® FX* (Bio-Rad) y se analiza mediante el programa *Quantity One®* v4.6.6 (Bio-Rad).

3.3.4.4 Preparación de bloques de agarosa con células de levadura a pequeña escala

Los clones identificados como positivos por PCR y *Southern blot* se analizaron mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para analizar las variaciones en el tamaño que ha sufrido el YAC. Para la PFGE se necesitan bloques de agarosa con células de levadura que se realizaron según protocolos descritos previamente (Giraldo, 2002). El protocolo se describe a continuación:

Se inoculan 10 ml de medio selectivo con 50 μ l del cultivo preservado a -80°C o con una colonia aislada de una placa, y se deja crecer a 30°C y en agitación hasta saturación. Se centrifugan los cultivos en tubos cónicos de 15 ml a $2000 \times g$, durante 5 minutos a TA, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 10 ml de EDTA 50mM pH 8, repitiendo este paso una vez más. Se centrifugan de nuevo las células y se resuspenden en 300 μ l de “solución I” [Sorbitol 1M, EDTA 20mM pH 8, β -mercaptoetanol 14mM, Zimoliasa 20T (MP Biomedicals) 2 mg/ml]. Se atempera en un baño a 40°C y se añaden 500 μ l de “solución II” [Sorbitol 1M, EDTA 20mM pH 8, β -mercaptoetanol 14mM, Agarosa *SeaPlaque*® GTG® 2% (Lonza)] atemperada también a 40°C . Se mezcla todo bien con ayuda de una pipeta P1000 (Gilson) y su punta con el extremo cortado, y se distribuye la mezcla en los moldes, 80 μ l en cada uno, usando esta vez una pipeta P200 (Gilson) y su punta también con el extremo cortado. Se deja solidificar la agarosa en los moldes incubándolos en hielo durante 10 minutos y se transfieren los bloques de agarosa a un nuevo tubo cónico de 15 ml con 4 ml de “solución III” [Sorbitol 1M, EDTA 20mM pH 8, Tris-HCl 10mM pH 7.5, β -mercaptoetanol 14mM, Zimoliasa 20T (MP Biomedicals) 2 mg/ml]. Se incuban a 37°C , durante 1 hora, en un baño con agitación (<100 rpm). Se sustituye la “solución III” por 5 ml de “solución IV” [dodecil sulfato de litio 1% (Sigma), EDTA 100mM pH 8, Tris-HCl 10mM pH 8] y se incuba 1 hora más a 37°C . Se reemplaza la “solución IV” por solución nueva y se deja incubando 14-16 horas a 37°C . Finalmente se lavan los bloques con 5 ml de NDS 20% [EDTA 0.5M, TRIS base 1mM (Roche), N-lauril sarcosina 34mM (Sigma), pH 9] durante 2 horas a TA y se preservan los bloques a 4°C en EDTA 50mM.

3.3.4.5 Electroforesis de gel en campo pulsado (PFGE)

Todos los geles utilizados se prepararon en Agarosa *SeaPlaque*® GTG® al 1% en tampón TBE 0.5X (Tris-Borato 100mM, EDTA 1mM pH 8.3). El sistema utilizado para la electroforesis de gel en campo pulsado o PFGE, por sus siglas en inglés (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), fue el *Gene Navigator*™ *Pulsed Field System* (Pharmacia Biotech). Como marcadores de peso molecular para

estos geles se usó el *DNA Size Standard S.cerevisiae* (Bio-Rad), que son bloques de agarosa de *S.cerevisiae* de la cepa YNN295, con un tamaño de cromosomas de 225, 285, 365, 450, 565, 610, 680, 750, 785, 825, 945, 1020, 1125, 1600 y 2200 kb.

Para todas las PFGE efectuadas, se utilizó un programa que separaba de forma óptima los YACs en un rango de tamaño que comprendía entre 450 y 680 kb. El programa consta de 1 única fase con pulsos de 60 segundos, durante 24 horas, a 200 V. Para la visualización de los cromosomas, posteriormente los geles se tiñeron durante 30 minutos en 1 litro de tampón TBE 0.5X con BrEt 0.5 µg/ml.

Una vez analizado el tamaño del YAC, se procedió a la transferencia de los cromosomas a una membrana de nylon para seguir con el análisis del YAC. La transferencia, fijación e hibridación se realizó de forma similar a los métodos descritos en el apartado 3.3.4.3, pero con la diferencia de que en este caso, previo al tratamiento con HCl 0.25N, se sometió el gel a una exposición con luz UV de onda corta (254 nm) durante 5 minutos, para ayudar a fragmentar las moléculas de ADN de gran tamaño, como son los cromosomas.

3.4 PREPARACIÓN DE YACs PARA MICROINYECCIÓN Y TRANSFECCIÓN

Para obtener cantidad suficiente del YAC para la generación de ratones transgénicos es necesario, en primer lugar, preparar bloques de agarosa a gran escala, posteriormente purificar el YAC mediante PFGE y finalmente un paso de concentración de ADN de éste. Todos estos procesos se llevaron a cabo mediante protocolos descritos (Giraldo, 2002; Fernandez et al., 2011).

3.4.1 PREPARACIÓN DE BLOQUES DE AGAROSA CON CÉLULAS DE LEVADURA A GRAN ESCALA

El procedimiento para preparar bloques de agarosa a gran escala es análogo a la preparación a pequeña escala, usando las mismas soluciones que en el apartado 3.3.4.4, con la diferencia de que, para gran escala, se parte de 200 ml de medio de cultivo y tiene como resultado la obtención de bloques de agarosa con una mayor densidad de células de levadura portadoras del YAC (Giraldo, 2002). Para ello, se crecen los 200 ml de medio selectivo con la levadura portadora del YAC a 30°C

hasta saturación. Se transfieren a tubos cónicos de 50 ml (Falcon™) y se centrifugan a 2000 x g, durante 5 minutos, a TA. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 80 ml de EDTA 50mM pH 8. Se centrifugan de nuevo las células en las mismas condiciones y se realiza un nuevo paso de lavado con 20 ml de EDTA 50mM pH 8, aprovechando este paso para juntar todas las células en un único tubo. A continuación, se pesa el precipitado final obtenido, asumiendo una densidad de 1 g/ml. Se atempera el precipitado a 40°C y se añade la mitad del peso celular en volumen de “solución I”, precalentada a 40°C. Se añade ahora 1 volumen, igual al que se tiene, de “solución II” a 40°C. Se mezcla suavemente y se reparten 80 µl en los moldes. Se incuban 10 minutos en hielo hasta que solidifique la agarosa y se pasan a un tubo que contenga 8 ml de “solución III” por cada 12 bloques de agarosa. Se incuba a 40°C durante 3 horas en agitación suave (<100 rpm). Se cambia la “solución III” por el mismo volumen de “solución IV” y se deja incubando a 40°C durante 1 hora en agitación suave (<100 rpm). Se reemplaza la “solución IV” por solución nueva y se deja incubando a 40°C durante 14-16 horas en agitación suave (<100 rpm). Finalmente se lavan los bloques con el mismo volumen de NDS 20% durante 2 horas a TA y se preservan los bloques a 4°C en EDTA 50mM.

3.4.2 PURIFICACIÓN DE YACs MEDIANTE PFGE

El producto de la purificación mediante PFGE es el ADN que se va a utilizar directamente para generar los ratones transgénicos. Por ello, durante el proceso de purificación de ADN de YAC existen varios puntos en los que hay que tener especial cuidado. En primer lugar hay que utilizar, en todo momento, material estéril y desechable para trabajar en las mejores condiciones de esterilidad posibles, con objeto de evitar el contacto con DNasas que comprometerían la integridad del cromosoma purificado. En segundo lugar, hay que evitar que la región del gel, del que se va a extraer el ADN, entre en contacto con el BrEt ya que, al intercalarse en el ADN y ante posibles exposiciones a luz UV, provocaría su rotura. En tercer lugar, el pipeteo de cualquier solución que contenga el YAC debe realizarse con puntas estériles con el extremo cortado, y con sumo cuidado, para evitar romper las moléculas de ADN ante los cambios bruscos de presión. Además, también con el fin de no romper el ADN, una vez purificado el YAC, nunca deberá congelarse y descongelarse, almacenándose única y exclusivamente a 4°C.

Siempre teniendo en cuenta estas condiciones, la purificación del YAC mediante PFGE se llevó a cabo según protocolos descritos previamente (Giraldo, 2002) y que brevemente se resume de la siguiente manera: se prepara un pocillo central más grande, de un gel de PFGE, uniendo siete

pocillos normales, de forma que entren unos 9 bloques de agarosa. En los pocillos que flanquean este pocillo central, se cargan fracciones de nuestros bloques de agarosa: $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$. Se corre el gel usando el programa elegido para la separación en ese rango de tamaño. Se corta el gel, con un bisturí estéril, en la dirección de migración del gel y con la ayuda de una regla, generando tres trozos: un trozo central que contiene todo nuestro pocillo grande y dos trozos laterales, que contienen las fracciones (Schedl et al., 1993b). Estos dos trozos laterales se tiñen con BrEt (0.5 $\mu\text{g/ml}$), mientras que, el que contiene la mayor parte del ADN, debe mantenerse en el mismo tampón de electroforesis (TBE 0.5X). Los trozos laterales teñidos se observan bajo luz UV para localizar el YAC, y se marca con unas muescas la altura a la que ha corrido el YAC y otras muescas seleccionando un cromosoma endógeno de la levadura que sea mayor que el YAC, y otro que sea menor. Se recompone el gel, asegurándose que los trozos laterales estén a la altura del fragmento central, pero sin entrar en contacto. Atendiendo a las marcas hechas para localizar el YAC y los dos cromosomas endógenos, con ayuda de un nuevo bisturí estéril y una regla, se cortan, en el fragmento que no se ha teñido, tres bloques longitudinales de agarosa; uno donde debería encontrarse el YAC, y otros dos donde deberían encontrarse los dos cromosomas endógenos. Estos bloques se separan en tres tubos cónicos de 50 ml, y se equilibran con tres lavados de 30 minutos en 50 ml de tampón TAE 1X. Los restos del gel se tiñen con BrEt para comprobar que se ha aislado correctamente la región que contiene al YAC y los dos cromosomas endógenos. Una vez equilibrados los bloques longitudinales de agarosa, se colocan en una cubeta horizontal de Ecogen (6.5x8 cm) en un ángulo de 90° en relación a la PFGE anterior. El bloque que contiene el YAC se coloca en el centro, y los otros dos bloques, con los cromosomas endógenos, se colocan uno a cada lado de tal forma que queden los tres alineados. Se secan cuidadosamente con ayuda de un papel de filtro y se rellena la cubeta, hasta la altura de los bloques, con agarosa NuSieve® GTG® (Lonza) al 4% en TAE 1X. Cuando se solidifica la agarosa, se realiza una electroforesis horizontal, aplicando una diferencia de potencial de 5 V/cm durante 6-9 horas. Una vez termina la electroforesis, se procede de la misma manera que con la PFGE: se generan tres trozos, y se procede a la tinción con BrEt de los trozos laterales, donde están nuestros cromosomas endógenos. Los trozos laterales teñidos se observan bajo luz UV, y se marca con una muesca la altura a la que ha corrido el ADN. Se recompone el gel y usando como referencia las muescas, y con ayuda de una regla, se corta con un bisturí estéril un cubito de agarosa en la región central donde debería estar el ADN del YAC. Este cubito de agarosa se pasa a un tubo cónico de 15 ml y se hacen 3 lavados con TAE 1X de 30 minutos cada uno. El resto del gel se puede teñir con BrEt para comprobar que se ha recogido todo el ADN. A continuación el cubito de agarosa se equilibra con 15 ml de tampón de equilibrado de YAC [TAE 1X, NaCl 100mM, Espermina 0.03mM (Sigma), Espermidina 0.07mM (Sigma)] durante 2 horas. Se coloca el cubito de agarosa en una superficie estéril, se seca

cuidadosamente con papel de filtro, se pesa y se transfiere a un tubo de 1.5 ml. Se calienta el tubo a 65°C durante 10 minutos hasta que se licua la agarosa. Se centrifuga a 20000 x g durante 5 segundos, y se atempera en un baño a 40°C. A continuación se añaden 4-8 U de gelasa (*GELase*™, Epicentre) por cada 100 mg de agarosa, que también debe estar atemperada para evitar que se vuelva a solidificar la agarosa. Se incuba a 40°C durante 3 horas, mezclando con mucho cuidado, con ayuda de una punta con el extremo cortado, cada hora. Se coloca el tubo en hielo durante 10 minutos para comprobar que la gelasa ha actuado, teniendo en cuenta que si la cantidad de agarosa sin digerir es muy grande, se debe repetir el proceso una vez más hasta la completa digestión de la misma. Se centrifuga a 20000 x g, durante 20 minutos, para precipitar los pequeños restos de agarosa que puedan quedar. Posteriormente, en una placa Petri con 40 ml de tampón de microinyección (Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 0.1mM pH 8, NaCl 100mM, Espermina 0.03mM, Espermidina 0.07mM) se coloca un filtro de diálisis (Millipore 0.05 µm), donde se pone la solución de agarosa líquida que contiene nuestro YAC y se deja dializando durante 2 ó 3 horas. Tras este tiempo, se recoge con sumo cuidado la gota que contiene el YAC, usando siempre puntas con el extremo cortado y estériles, y se almacena a 4°C, hasta su utilización para la generación del ratón transgénico. Para la obtención de resultados óptimos en la transgénesis, estas preparaciones deben utilizarse en un máximo de 2 semanas desde la purificación del YAC. Por último se valora la concentración de ADN del YAC usando el espectrofotómetro NanoDrop-1000, o bien, mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa 0.8%, comparando la intensidad de fluorescencia con otras muestras de YACs de tamaño similar y concentración conocida, permitiendo que la muestra sólo entre unos 2 cm en la matriz del gel, y posterior visualización bajo luz UV.

3.5 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS

Se procedió a la generación de ratones transgénicos, con los diferentes YACs purificados, mediante microinyección en oocitos fecundados y transfección de células embrionarias pluripotentes (células ES) de ratón, y posterior generación de ratones quiméricos.

3.5.1 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS MEDIANTE MICROINYECCIÓN

La generación de ratones transgénicos mediante microinyección se llevó a cabo en el Servicio de Transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología y Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CNB-CBMSO-CSIC). Se realizó mediante microinyección del YAC, a una concentración de 0.5-1 ng/µl, en pronúcleos de oocitos fecundados de ratón utilizando procedimientos estándar (Hogan et al., 1994; Montoliu, 1997). Los oocitos utilizados son B6CBAF2 provenientes de cruzar ratones

B6CBAF1/OlaHsd entre sí, debido a que está descrito que la utilización de estos ratones muestra eficiencias mayores de transgénesis mediadas por microinyección (Auerbach et al., 2003).

3.5.2 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES DE RATÓN Y POSTERIOR GENERACIÓN DE RATONES QUIMÉRICOS

Todo el proceso, salvo el análisis sistemático de los clones de células ES seleccionados tras la transfección, se llevó a cabo en la Unidad de Transgénesis del Programa de Biotecnología del CNIO, Madrid.

3.5.2.1 Línea celular ES y medio de cultivo

La línea celular ES utilizada fue *Bruce4*, cedida amablemente por el Dr. Colin Stewart (Köntgen & Stewart, 1993) y aunque deriva originalmente de la cepa de ratón C57BL/6, se ha observado cierta variación genética al compararla con ratones C57BL/6 (Hughes et al., 2007).

El cultivo de células ES se realizó según protocolos descritos (Li et al., 2011) El medio de cultivo para mantener las células ES (medio ES) tiene la siguiente composición: KO-DMEM (Invitrogen), conteniendo 4500 mg/ml de glucosa y piruvato sódico suplementado con 15% de suero fetal bovino (FCS) (Hyclone), Glutamax 2mM (Invitrogen), β -mercaptoetanol 50 μ M, aminoácidos no esenciales 100 μ M (Invitrogen), penicilina/estreptomicina a 50 U/ml y 50 μ g/ml respectivamente (Sigma) y 1000 U/ml de LIF [*ESGRO*® (Millipore)]. Las células ES se cultivan a 37°C, 7% CO₂ y 95% de humedad en placas recubiertas por una capa de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente, para evitar su diferenciación (*feeders*) (Li et al., 2011).

Adicionalmente, para la selección de células ES tras la transfección, se utilizó medio suplementado con el antibiótico G418 (Geneticin®, Invitrogen) a una concentración de 200 μ g/ml. La geneticina es un antibiótico análogo a neomicina, y el gen *neo* es capaz de conferir resistencia a ambas.

3.5.2.2 Transfección de células ES de ratón con ADN del YAC

Para introducir el YAC en las células ES de ratón se utilizó el método de lipofección, descrito como el método más eficiente para transfectar YACs a células de mamífero en cultivo y que luego puedan encontrarse moléculas intactas integradas (Wada et al., 1994). El ADN del YAC se recubre por lípidos, formando un liposoma, para su transfección. Este liposoma interactúa directamente con la membrana plasmática de la célula, y posteriormente el ADN se introduce por endocitosis.

La transfección se llevó a cabo en placas de 24 pocillos, usando células crecidas >90% de confluencia. Se realizó una cotransfección del YAC con el vector pPNT (gen de resistencia a neomicina con el promotor del gen *Pgk-1* de ratón) (Tybulewicz et al., 1991) con el fin de aumentar la resistencia a neomicina del YAC. Se utilizaron las siguientes cantidades para la transfección: 500 ng de YAC + 5 ng de vector, 500 ng de YAC + 10 ng de vector, 500 ng + 20 ng de vector y 500 ng de YAC + 40 ng de vector. Para la lipofección se utilizó el reactivo de transfección *Lipofectamine™ 2000* (Invitrogen), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

3.5.2.3 Análisis de clones de células ES

El análisis completo de clones ES implica, primero, la identificación de los clones que porten el YAC íntegro mediante PCR; y posteriormente, en los clones positivos, un análisis de expresión del gen *APP* mediante RT-PCR cuantitativa y *western blot*, usando el mismo protocolo, para estas últimas técnicas, que se utiliza en el análisis de expresión del gen *APP* en ratones transgénicos, detallado en el apartado 3.6.2.

3.5.2.3.1 Extracción de ADN genómico de células ES

Aproximadamente entre 7 y 10 días después de la lipofección y selección en G418, las colonias de células ES se pican y se pasan individualmente a placas de 96 pocillos, que contienen medio de cultivo de células ES y *feeders*. Estas colonias se crecen durante 2 días en presencia de G418 a 200 µg/ml, posteriormente se tripsinizan [0.25% tripsina/EDTA (GIBCO)] y se hacen 3 réplicas en placas de 96 pocillos en las mismas condiciones de cultivo. Dos de estas placas se congelan a -80°C, con 24 horas de diferencia entre la primera réplica y la segunda. La primera réplica se congela después de aproximadamente 24-48 horas en cultivo. Para su congelación las células se tripsinizan en el pocillo con 30 µl de tripsina a 37°C 5 minutos. A continuación se añaden 70 µl de medio ES y se resuspenden las células. A continuación se añaden 100 µl de medio de congelación 2x (FCS 50%, DMSO 20% y medio ES 30%) y después de haber mezclado bien se almacenan las placas a -80°C (Li et al., 2011). La tercera placa se deja creciendo durante 2 días. Después, con ayuda de una pipeta Gilson P200 se pasa cada clon a un pocillo de una placa de 24 pocillos. Las colonias de las placas de 24 pocillos se expanden durante otros 3 ó 5 días hasta que las células ES están confluentes. Se aspira el medio de cada pocillo y se lavan las células con 1.5 ml de tampón fosfato salino (PBS) 1X. Se añaden 500 µl de tampón de lisis (NaCl 100mM, Tris-HCl 20mM pH 8, EDTA 10mM, SDS 0.5%) con proteinasa K (Roche) 400 µg/ml. Se deja asentar durante 5 minutos. Con ayuda de una pipeta Gilson P1000, con una punta con el extremo cortado, se mezcla el lisado y se transfiere la solución viscosa a un tubo de 1.5 ml. Se incuban los lisados a 55°C durante 14-16 horas. Se añaden 300 µl de

NaCl saturado (>6M). Se invierten los tubos entre 25-50 veces y se dejan en hielo durante 10 minutos. Se centrifugan a 18000 x g, durante 15 minutos, a 4°C. Se vuelven a poner los tubos en hielo y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml teniendo especial cuidado en no recoger nada de los restos precipitados. Se añaden 800 µl de isopropanol a 4°C y se mezcla por inversión durante 25-50 veces hasta que se vean precipitados de ADN genómico y la solución sea homogénea. Se deja en hielo durante 15 minutos. Se centrifuga a 18000 x g, durante 10 minutos, a 4°C. Se aspira el sobrenadante. Se lava el precipitado con 1 ml de etanol 70% y se centrifuga de nuevo a 18000 x g, durante 5 minutos, a TA. Se elimina por decantación el etanol y se deja secar el precipitado. Finalmente se resuspende el precipitado en 50 µl de TE pH 7.5. Se incuba a 42°C durante 2-3 horas o a 55°C durante 15 minutos para conseguir resuspender completamente el ADN y se almacena a 4°C.

3.5.2.3.2 PCR de ADN genómico de células ES

Las diferentes PCRs a lo largo de todo el YAC se realizaron en todos los clones seleccionados. Se utilizó 1 µl de una dilución 1/10 de ADN genómico de células ES extraído (50-80 ng) en un volumen final de 25 µl y en las condiciones de mezcla de reacción ya descritas con anterioridad (ver sección 3.1.2.4). El resultado se analizó en geles de electroforesis de agarosa.

3.5.2.3.3 Southern blot de ADN genómico de células ES

Los YACs son moléculas grandes y frágiles de ADN, por lo que pueden fragmentarse durante los diferentes procesos de purificación y transfección; y por consiguiente, obtenerse células ES que sólo hayan sido capaces de incorporar el YAC de forma parcial. De ahí que el *Southern blot* sea un método de análisis necesario en los clones positivos para el YAC, ya que, además de informar de la presencia del transgén, permite verificar su integridad.

Para el análisis por *Southern blot* se digirieron entre 10-30 µg de ADN genómico de células ES con la enzima de restricción adecuada, en un volumen final de 60 µl con el tampón de digestión 1X correspondiente y Espemidina 4mM. Los productos de digestión se resolvieron electroforéticamente de forma similar a las digestiones de ADN genómico de levadura, al igual que la transferencia y posterior hibridación (apartado 3.3.4.3).

3.5.2.4 Generación de ratones quiméricos

Una vez seleccionado el clon que porta el YAC íntegro y es capaz de expresar el gen *APP*, se procede a la generación de embriones quiméricos por medio de la inyección de las células ES seleccionadas en la blastocela de un blastocisto según métodos descritos (Nagy et al., 2003). Cada

blastocisto fue inyectado con 5-7 células ES. La cepa de ratón donante de blastocistos elegida fue la cepa [B6(Cg)-Tyr^{c-2J}/J] (Jackson Laboratory) que contiene, en homocigosis, una mutación espontánea que inactiva el gen que codifica la enzima tirosinasa (Tyr), resultando en un fenotipo albino (Zurita et al., 2010). Debido a que las células ES proceden de la cepa C57BL/6 (ratón con pigmentación negra) las quimeras con contribución de las células ES en la piel se distinguen por la presencia de manchas negras en el pelaje albino. La extensión del color negro en la piel refleja el grado de contribución de las células ES al embrión.

3.5.3 IDENTIFICACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS

3.5.3.1 Extracción de ADN genómico de ratón

La extracción de ADN genómico de ratón se realizó a partir de biopsia de la cola (<1 cm), obtenida en el momento del destete de los ratones, siguiendo protocolos ya descritos (Montoliu, 1997).

3.5.3.2 PCR de ADN genómico de ratón

Se realizaron una serie de PCRs de diferentes secuencias de ADN a lo largo de todo el YAC como método de identificación y análisis de los ratones transgénicos fundadores y quiméricos. Todas las PCRs, sobre ADN genómico de ratón, se realizaron con 1 µl de una dilución 1/50 de la solución de ADN obtenida de biopsia de cola en un volumen final de 25 µl y en las condiciones de mezcla de reacción ya descritas con anterioridad (ver sección 3.1.2.4). El resultado se analizó en geles de electroforesis de agarosa.

3.5.3.3 Southern blot de ADN genómico de ratón

Al igual que en las células ES, el *Southern blot* es un método de análisis necesario en los ratones transgénicos fundadores y transgénicos ya que, además de informar de la presencia del transgén, permite verificar su integridad. Este *Southern blot* de ADN genómico de ratón se llevó a cabo mediante métodos ya descritos (Schedl et al., 1993b; Montoliu et al., 1996). Brevemente el protocolo consiste en la digestión entre 10-30 µg de ADN genómico de ratón con la enzima de restricción adecuada en un volumen final de 60 µl con el tampón de digestión 1X correspondiente y Espermidina 4mM. Los productos de digestión se resuelven electroforéticamente de forma similar a las digestiones de ADN genómico de levadura, al igual que la transferencia y posterior hibridación (ver sección 3.3.4.3).

3.5.4 TRANSMISIÓN A LA LÍNEA GERMINAL

Los ratones identificados como portadores del YAC, tanto los fundadores generados por microinyección como las quimeras, se cruzaron con ratones de la cepa C57BL/6JOlaHsd y se analizó su progenie. El análisis de la transmisión del YAC a la descendencia se realizó mediante tres PCRs: de un brazo del YAC (*lys2*) del otro brazo (*leu2* o *trp1*) y del exón 6 del gen *APP*.

3.5.5 MANTENIMIENTO DE COLONIAS

Los ratones obtenidos en este trabajo fueron mantenidos en la zona de barrera del animalario del CNB en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*), en jaulas con agua y pienso irradiado (Harlan Teklad) *ad libitum*, con un ciclo nictameral controlado por luz artificial (300 lx) de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (luz de 8:00 a 20:00), temperatura de $22\pm1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $50\pm15\%$ y aire filtrado con filtros EU13 HEPA, con tasa de renovación de 20 veces/hora.

La amplificación de las líneas transgénicas fue establecida por cruces de ratones portadores del YAC con ratones C57BL/6JOlaHsd, manteniéndose el YAC en hemigogosis. Las crías de ratón se destetaron 21 días después del parto, separándose a partir de ese momento por sexos. La identificación de los ratones se realiza mediante la colocación de pendientes metálicos numerados del 0001 al 9999 con una letra identificativa (A0001–Z9999) (National Band & Tag Company: <http://www.nationalband.com/>).

El seguimiento de las colonias se realizó a través de la base de datos Ratón (Montoliu et al., 1993).

3.6 ANÁLISIS DE RATONES TRANSGÉNICOS

3.6.1 CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL YAC

La determinación del número de copias en la primera generación filial (F1) de las líneas de ratones transgénicos se realizó mediante PCR cuantitativa sobre ADN genómico y mediante *slot blot*.

3.6.1.1 qPCR de ADN genómico

La determinación del número de copias mediante PCR cuantitativa se llevó a cabo basándose en protocolos ya descritos (Providenti et al., 2006). Se utilizó ADN genómico de ratón extraído a partir de biopsia de cola (0.5 cm) utilizando el *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche), siguiendo

las indicaciones del fabricante. Todas las muestras se ensayaron en placa de 96 pocillos, por triplicado, usando 2 µl de una dilución 1/250 del ADN genómico de ratón (aprox. 1 ng) en 15 µl totales. Para la mezcla de reacción se utilizó el *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que contiene todos los reactivos necesarios para la qPCR, excepto los cebadores (*SYBR Green I*, que es un fluorocromo utilizado para la cuantificación de ADN de doble cadena en la qPCR, ADN polimerasa *AmpliTaq Gold®*, dNTPs, MgCl₂, tampón de reacción y el agente de referencia pasiva ROX) a las condiciones universales descritas por el fabricante. Los cebadores utilizados se usaron a una concentración de 100nM y fueron diseñados para amplificar una secuencia genómica de 102 pb del gen *APP* humano, presente en el YAC, y como control interno (*Housekeeping*) una secuencia genómica de 108 pb del gen *Profilina1* de ratón (gen normalizador) (apartado 3.2.4).

La PCR se llevó a cabo en el sistema *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems), que permite analizar la amplificación a tiempo real de las muestras, con un programa que consta de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Los datos obtenidos se analizaron con el *7500 Software v2.0.5* (Applied Biosystems).

Como patrón a partir del cual realizar la cuantificación absoluta, se utilizaron diluciones sucesivas de ADN genómico de cantidad conocida (10, 2, 0.4 y 0.08 ng). Tras la realización de una recta patrón, tanto para el transgén como para el control interno, en la que se representó la cantidad de ADN amplificado de cada dilución por el valor obtenido de *Ct* (*threshold cycle*: ciclo de la reacción de amplificación en el que por primera vez, debido a la generación del amplicón, la señal de fluorescencia observada es superior a la basal), se obtuvo la cantidad de ADN amplificado de cada muestra experimental al aplicar los diferentes valores de *Ct* en la ecuación de la recta patrón. Los resultados obtenidos para el gen *APP* se normalizaron con el control interno, generando así la relación entre el número de copias del transgén y el control interno, obteniendo el número de copias del YAC que se habían integrado en cada línea transgénica.

3.6.1.2 Slot blot

Para la determinación del número de copias mediante *slot blot*, se utilizó el aparato *MINIFOLD II* (Schleicher & Schuell) que permite procesar hasta 72 muestras simultáneamente, siguiendo las indicaciones del fabricante y procedimientos descritos (Montoliu, 1997; Giraldo, 2002; Giraldo et al., 2003). Se analizaron 10 µg del ADN genómico de ratón, por triplicado, y se comparó, mediante densitometría, la intensidad de la señal obtenida tras la hibridación con una sonda específica del YAC (Región 3'UTR del gen *APP* humano), con una recta patrón de número de copias. Para la realización

de esta recta patrón se añadieron distintas cantidades del YAC purificado a 10 µg de ADN genómico de ratón no transgénico, teniendo en cuenta que el YAC se encuentra en hemigiosis. Cada cantidad añadida de YAC correspondía a un número de copias determinado según la siguiente relación:

$$\frac{\text{masa de ADN del YAC (1 copia)}}{\mu\text{g de ADN genómico de ratón a analizar}} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de pb YAC}}{\text{n}^{\circ} \text{ de pb ADN genómico de ratón diploide}} ;$$

$$\frac{\text{masa de ADN del YAC (1 copia)}}{10 \mu\text{g de ADN genómico de ratón}} = \frac{565.000 \text{ pb YAC}}{6 \times 10^9 \text{ pb ADN genómico de ratón}}$$

$$\text{masa de ADN del YAC (1 copia)} = 0.000942 \mu\text{g} = 0.942 \text{ ng}$$

Siguiendo esta equivalencia se realizó una recta patrón desde 1 hasta 10 copias.

3.6.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *APP* HUMANO

3.6.2.1 Perfusión y disección de ratones para extracción de ARN y proteínas

Previamente a la perfusión, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de una solución en suero fisiológico (15 ml/kg de peso) conteniendo 2% de *Rompun*® (Bayer) y 50 mg/ml de *Ketolar*® (Parke-Davis). Posteriormente, los ratones fueron perfundidos intraventricularmente con 20 ml de PBS 1X con dietilpicrocarbonato (DEPC) (Sigma) al 0.1%. A continuación, se procedió a la disección y extracción de los siguientes órganos y tejidos: pulmón, corazón, estómago, intestino, hígado, riñón, bazo, gónadas, médula espinal y encéfalo. Posteriormente se realizó un corte longitudinal en el centro del encéfalo, una mitad se denominó encéfalo o cerebro en sí, y la otra se dividió a su vez en cuatro partes que se denominaron de forma arbitraria: mesencéfalo (que además del mesencéfalo incluye los colículos superior e inferior, el puente, la médula oblonga y la parte superior de la médula espinal), corteza (que incluye el córtex cerebral, el hipocampo, la fimbria del hipocampo, el cuerpo caloso, el estriado y los bulbos olfatorios), diencefalo (que incluye el tálamo, el hipotálamo, el fórnix y el área preóptica) y cerebelo (**Figura MM.1**). Todos los órganos fueron congelados y almacenados a -80°C.

Previamente a la extracción del ARN y de las proteínas, los tejidos fueron descongelados y homogeneizados mecánicamente, en tubos de 1.5 ml conteniendo 400 µl de PBS 1X con DEPC al 0.1%, con ayuda de un homogeneizador *Retsch*® *MM300* (Retsch GmbH).

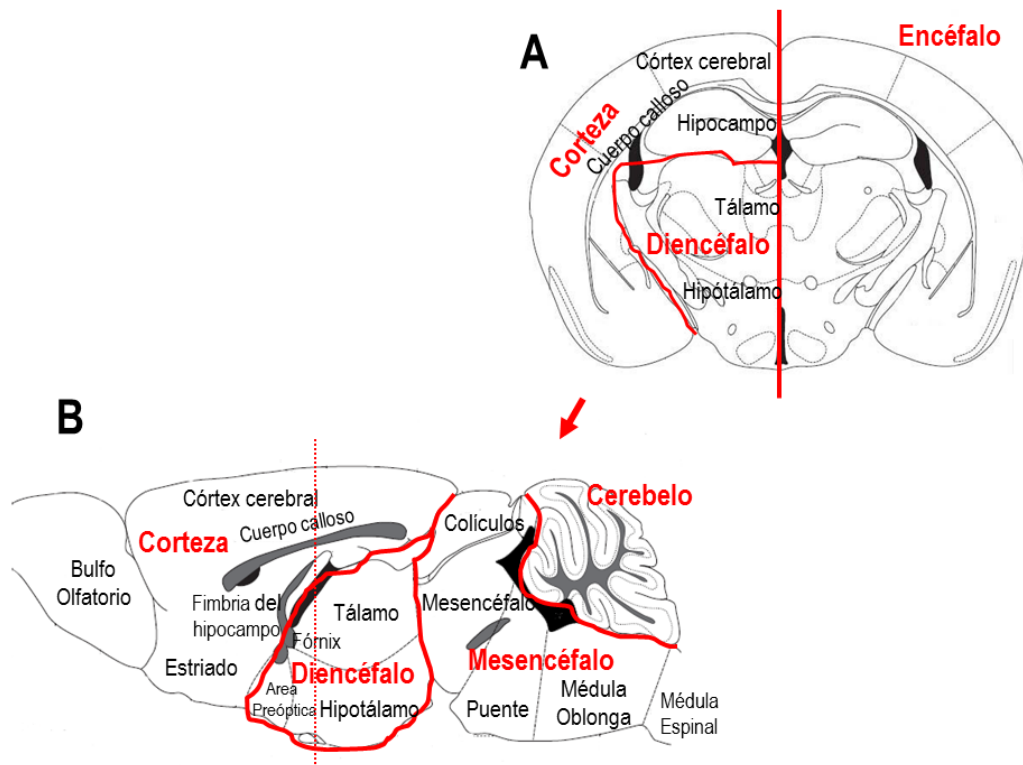


Figura MM.1. Esquema de la disección del encéfalo de ratón. Se realizó un corte sagital dividiendo el cerebro de ratón en dos mitades iguales, la mitad izquierda se denominó encéfalo o cerebro en sí, y la mitad derecha se diseccionó a su vez en mesencéfalo, diencefalo, corteza y cerebelo. (A) Vista coronal y (B) vista sagital. La línea discontinua de puntos en (B) representa la región del cerebelo que se observa en el corte de (A). Esquema adaptado de "The mouse brain in stereotaxic coordinates", Keith BJ Franklin, 1997.

3.6.2.2 Extracción de ARN total

El ARN fue extraído de los diferentes tejidos a partir de 50 µl de muestra homogeneizada. Se realizó utilizando un kit comercial de extracción en columnas *High Pure RNA Isolation kit* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el fin de valorar la cantidad y calidad del ARN obtenido, se analizaron las muestras en el espectrofotómetro NanoDrop-1000.

3.6.2.3 Cuantificación de ARN mensajero (ARNm) por PCR con transcriptasa reversa cuantitativa (RT-PCR cuantitativa)

La RT-PCR cuantitativa es una técnica que se lleva a cabo básicamente en dos etapas. La primera etapa es la transcripción reversa, que consiste en la síntesis de ADN de doble cadena (ADNc) utilizando como molde ARN monocatenario. Para ello se usó el *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante, añadiendo 0.5 µg de ARN molde a un volumen final de reacción de 50 µl. Se incubaron las muestras 10 minutos a 25°C y 2 horas a 37°C usando el termociclador MJ Mini (Bio-Rad). Finalmente, el producto obtenido se almacenó a -20°C.

La segunda etapa es una qPCR. Para la cuantificación del ARNm se analizaron 0.5 µl del ADNc obtenido en el ensayo de transcripción reversa. Los cebadores y sondas para el ensayo de

qPCR para el ARNm del *APP* humano y *App* murino se obtuvieron de un ensayo prediseñado [Assay-on-Demand (Applied Biosystems) (códigos: Hs00169098-M1 y Mm00431827-M1 respectivamente)]. Para realizar la PCR a tiempo real se utilizó un sistema *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Se siguieron las condiciones de amplificación suministradas por el proveedor. Para la normalización se usó como gen endógeno *18S* ARNr, ya que la expresión de este gen se mantiene constante en todo momento, utilizando también un ensayo prediseñado [Assay-on-Demand (Applied Biosystems) (código: hs99999901_S1)]. Las reacciones fueron desarrolladas en condiciones universales usando la mezcla de reacción *Taqman PCR* (Applied Biosystem). Para excluir potenciales contaminaciones de los reactivos de la RT-PCR o de la presencia de ADN genómico, se usaron como controles negativos reacciones sin muestra o con ARN (en vez de ADNc), respectivamente.

Una vez realizada la RT-PCR cuantitativa, los valores de *Ct* obtenidos fueron analizados utilizando el software SDS v.2.4 (Applied Biosystem). La cuantificación relativa se realizó mediante el principio básico del ΔC_t , que asume que la diferencia en el valor del *Ct* entre el gen *APP* humano ó *App* murino y el gen normalizador *18S* puede transformarse en cantidades relativas empleando la función exponencial en la que la eficiencia de la PCR actúa como base ($E^{-\Delta C_t}$). Debido a que la eficiencia en estos ensayos prediseñados se considera el 100%, se estima en base 2 ($2^{-\Delta C_t}$). Finalmente se representaron los valores de expresión relativa tanto del gen *APP* humano como del gen *App* murino.

3.6.2.4 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Las proteínas fueron extraídas a partir de 50 μ l de muestra homogeneizada a la que se añadió 50 μ l de tampón de lisis 2X [Tritón X-100 (Sigma) 1%, EDTA 5mM en PBS] suplementado con un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche). Los lisados se incubaron a 4°C durante 30 minutos y se centrifugaron a 12000 x g, durante 15 minutos, a 4°C. Se recogió el sobrenadante con las proteínas solubilizadas por el tampón de lisis y se congeló a -20°C hasta su utilización, separando una alícuota para valorar la concentración de proteínas.

La cuantificación de la concentración de proteínas de los lisados se realizó mediante el método BCA (Pierce), utilizando como patrón diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.2.5 Inmunomarcado después de electrotransferencia proteica (*western blot*).

3.6.2.5.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (*SDS-PAGE*)

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó según el método discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles concentradores de poliacrilamida al 5% y geles separadores de poliacrilamida al 8% debido al peso molecular de la proteína APP a analizar. Como tampón de muestra se utilizó Tris-HCl 25mM pH 6.3, glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.01%. Como patrones de peso molecular se emplearon los marcadores preteñidos *Precision Plus Protein™ Standards* (Bio-Rad) (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa).

3.6.2.5.2 Electrotransferencia proteica.

Las proteínas resueltas en *SDS-PAGE* se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) con un tamaño de poro de 0.45 μ m con una corriente de 5.5 mA/cm² mediante el método de transferencia electroforética semi-seca. Después de visualizar las proteínas transferidas mediante la tinción con rojo Ponceau S (Sigma), se saturó la membrana, durante 14-16 horas, a 4°C en PBS-leche 5% (leche desnatada en polvo, Central Lechera Asturiana), Tween-20 (Merck) 0.2%, con objeto de bloquear uniones inespecíficas.

3.6.2.5.3 Inmunodetección y revelado.

La membrana de nitrocelulosa se incubó con los distintos anticuerpos primarios a las diluciones adecuadas en tampón de dilución de anticuerpo (PBS-leche 1% y Tween-20 al 0.05% o PBS-BSA 1% y Tween-20 al 0.05% según el anticuerpo utilizado) durante 2 horas a TA. Posteriormente, se hicieron 3 lavados, de 10 minutos cada uno, con tampón de lavado (PBS-Tween-20 0.05%) y se incubó 2 horas a TA con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (POD), diluido 1:50.000 en tampón de dilución de anticuerpo. Tras 3 nuevos lavados con tampón de lavado, la señal de los anticuerpos se reveló utilizando el reactivo quimioluminiscente intensificado *ECL™* (GE Healthcare). La peroxidasa, presente en el anticuerpo secundario, cataliza la oxidación del reactivo luminol en presencia de H₂O₂. Posteriormente, se cuantificó la intensidad de las bandas resultantes mediante densitometría [densitómetro GS-710 “*Calibrated Imaging Densitometer*” (Bio-Rad)].

3.6.2.5.4 Anticuerpos

En el presente estudio se han utilizado los siguientes anticuerpos:

- **Anti-A β (6E10):** anticuerpo primario monoclonal purificado de ratón (Covance) que reconoce los residuos 1-16 de la secuencia de Beta Amiloide (A β) humana. Dilución utilizada para inmunotransferencia proteica: 1/400 (Lamb et al., 1993; Venezia et al., 2004).
- **Anti-Alzheimer precursor protein A4 (clon 22C11):** anticuerpo monoclonal purificado de ratón (Millipore) que reconoce un epítipo N-terminal, correspondiente a los aminoácidos 66-81, de la proteína APP humana y murina. Dilución utilizada para inmunotransferencia proteica: 1/3000 (Loers et al., 2004).
- **Anti-tubulina:** anticuerpo primario monoclonal purificado de ratón, clon B-5-1-2 (Sigma), que reconoce un epítipo del extremo C-terminal de la isoforma α de la tubulina. Dilución utilizada para inmunotransferencia proteica: 1/10000 (Barnett et al., 2007).
- **Anti inmunoglobulina de ratón acoplado a peroxidasa:** anticuerpo secundario policlonal de cabra (Millipore). Dilución utilizada para inmunotransferencia proteica: 1/50000 (Hung et al., 2002).



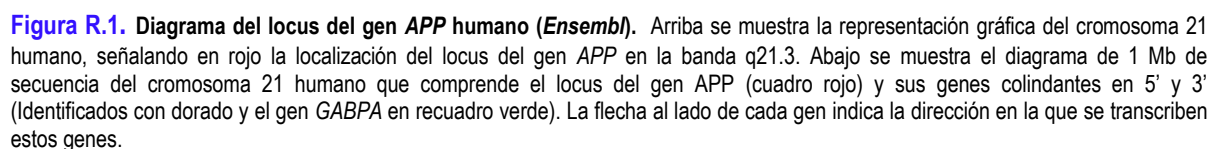
4 RESULTADOS

1997. Autorretrato de William Utermohlen (Verde)

Galería Beckel Odille Boïcos, Paris

Dos años después de su diagnóstico, los autorretratos empiezan a ser notablemente diferentes, apreciándose ciertas asimetrías. Las formas se vuelven más borrosas. A través de este autorretrato se pueden apreciar los sentimientos de tristeza, ansiedad, resignación y debilidad, que acompañan al artista. El fondo negro representa el final.

Gracias a la secuenciación del genoma humano (Pennisi, 2000; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), se actualizó la localización de los genes vecinos al locus del *APP*, encontrándose en la región 5' de éste el gen *CYYR1* (*cysteine/tyrosine-rich 1*, ENSG00000166265) y en la región 3' el gen *GABPA* (*GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa*, ENSG00000154727) y el gen *ATP5J* (*ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F6*, ENSG00000154723). (Figura R1).



4.1.2 DELIMITACIÓN DEL YAC APP-8

4.1.2.1 Delimitación de la región 5'

A pesar de que el YAC APP-8 había sido utilizado en varias ocasiones para la generación de ratones transgénicos (Buxbaum et al., 1993; Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993) se desconocía la secuencia exacta de ADN genómico humano que contenía.

Para la delimitación de la secuencia humana del YAC APP-8 (clon B142F9) situada en la región 5' del gen *APP*, se diseñaron una serie de PCRs en el YAC, usando los cebadores de la **Tabla MM.2**, hasta las 175 kb por encima del inicio del gen *APP*. Mediante estas PCRs, que amplificaban sucesivos fragmentos analíticos, se pudo comprobar que el YAC albergaba la secuencia 4 (Sec4), pero la secuencia 5 (Sec5) ya no estaba presente (**Figura R.2A**).

Con el fin de acotar todavía más esta región, se procedió a un nuevo diseño de PCRs entre las Sec4 y Sec5 (entre ambas secuencias había una diferencia de 20 kb), diseñadas aproximadamente cada 4 kb (secuencias 5.1 a 5.4, **Tabla MM.2**), observándose que la última secuencia presente en el YAC era la Sec5.3, mientras que la Sec5.2 no se encontraba, por lo que el límite del YAC en esta región debía encontrarse entre las 162 y 166 kb por encima del inicio del gen *APP* (**Figura R.2B**).

Finalmente, usando el cebador de la última secuencia presente, Sec5.3 L, y un cebador propio del extremo del brazo Ura del YAC, perteneciente a secuencia del plásmido pYAC4 (uraArm F, **Tabla MM.1**), se procedió a la realización de una PCR híbrida con el fin de obtener una banda apropiada para la posterior secuenciación y poder así delimitar exactamente la secuencia humana del YAC en esta región. Se obtuvo una banda de aproximadamente 1000 pb, se envió a secuenciar usando los mismos cebadores de la PCR híbrida, y se determinó finalmente que la secuencia humana en el YAC en la región 5' llegaba hasta las 163304 pb por encima del inicio del gen *APP* [posición 21:27,706,275 del genoma humano (GRCh37/hg19)] (**Figura R.2C**), coincidiendo con un corte para la enzima *EcoR* I, enzima utilizada para la creación de la genoteca de YACs.

4.1.2.2 Delimitación de la región 3'

Al igual que en la región 5', para la delimitación de la secuencia humana del YAC situada en la región 3' del gen *APP*, se diseñaron una serie de PCRs consecutivas (**Figura R.2A**), y finalmente se realizó una PCR híbrida entre el brazo Trp del YAC (trpArm R, **Tabla MM.1**) y el cebador de la última secuencia de ADN detectada por PCR (**Figura R.2B**) (cebador SecC.1 F, **Tabla MM.4**), a fin de

obtener una banda para secuenciar y poder así delimitar exactamente la secuencia humana del YAC en esta región. Se determinó finalmente que la secuencia humana en el YAC en la región 3' llegaba hasta las 147455 pb después del final del gen *APP* [posición 21:27,105,406 del genoma humano (GRCh37/hg19)] (Figura R.2C).

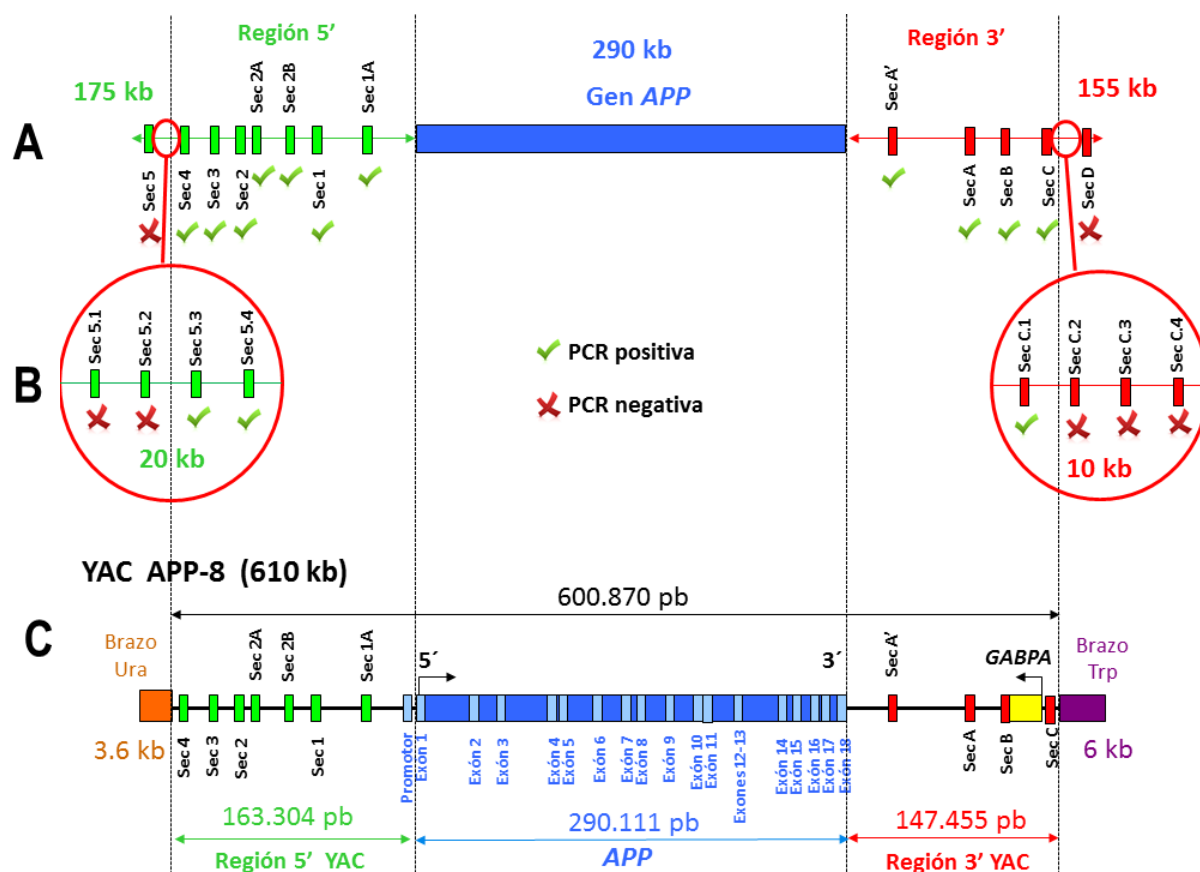


Figura R.2. Delimitación y tamaño del YAC APP (esquema). (A) PCRs diseñadas para delimitar el YAC APP-8. Se diseñaron PCRs que amplificaban sucesivos fragmentos analíticos en ambos extremos del gen *APP* hasta las 175 kb en la región 5' y hasta las 155 kb en la región 3'. (B) Entre la última PCR positiva y negativa, con el fin de acotar más esta región de 20 kb en el extremo 5' y de 10 kb en el extremo 3', se diseñaron 4 nuevas PCRs analíticas. La PCR positiva aparece identificada con un tick verde y la negativa con un aspa rojo. Las secuencias no se representan en el esquema a la misma escala. (C) Utilizando un cebador correspondiente a la última secuencia positiva para la PCR en cada extremo y un cebador de cada uno de los brazos del YAC se realizó una PCR híbrida y se mandó a secuenciar dicho fragmento para conocer la secuencia exacta del YAC por ambos extremos. Se ha señalado el tamaño exacto para el gen *APP* (azul), para las regiones 5' (verde) 3' (rojo) y el tamaño total (en negro) de la secuencia humana del cromosoma 21 en este YAC APP-8 (600870 pb). Con las 3.6 kb del brazo Ura (naranja) y las 6 kb del brazo Trp (morado) el YAC suma un total de 610 kb. También aparecen representadas, manteniendo la posición aproximada, varios de los fragmentos analíticos de ADN obtenidos mediante PCRs diseñados a lo largo del YAC, marcadas con el color de la zona a la que corresponden.

4.1.3 TAMAÑO DEL YAC

El tamaño de 650 kb del YAC APP-8, presente en el clon B142F9, se determinó en el año 1993 mediante la técnica de PFGE (Lamb et al., 1993). Sin embargo, la secuenciación del genoma humano (Pennisi, 2000; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) y el proceso de delimitación llevado a

cabo en el punto anterior, ha permitido conocer por vez primera el tamaño exacto de este YAC y la región humana que engloba. Dicho YAC contiene una secuencia del cromosoma 21 humano de 600870 pb [coordenadas genómicas 21:27,105,406-27,706,275 (GRCh37/hg19)], por lo que se pudo comprobar que en la región 5' no aparece ningún gen, pero sí en la región 3', donde aparece en el extremo final la secuencia completa del gen *GABPA*. Si además se suman los dos brazos del plásmido pYAC4, el YAC consta de un tamaño total de 610570 pb (610 kb). En la **Figura R.2C** aparece esquematizado el YAC APP-8 (clon B142F9), utilizado anteriormente para la generación de ratones transgénicos (Buxbaum et al., 1993; Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993).

4.2 MODIFICACIONES DEL YAC

4.2.1 TRANSFERENCIA DEL YAC A LA CEPA *WINDOW* YLBW4

La realización de una PFGE del clon B142F9, portador del YAC APP-8 en la cepa AB1380, permitió separar todos los cromosomas de la levadura, incluyendo el YAC, en función de su tamaño. A través de este PFGE se pudo comprobar que el YAC se encontraba muy próximo en tamaño a un cromosoma endógeno de dicha cepa. Esto podría acarrear un problema en el futuro paso de purificación de ADN del YAC a través de PFGE, ya que se podría producir la copurificación del YAC con este cromosoma endógeno de la levadura. Por ello se decidió transferir el YAC a una nueva cepa de levadura, diseñada específicamente para solventar este problema, denominada *window* porque deja una “ventana” o zona electroforética en la PFGE para albergar el YAC de interés (Hamer et al., 1995). Las levaduras *windows* son una familia de 9 miembros (YLBW1-YLBW9), cada una de las cuales mantiene una diferente zona electroforética libre de cromosomas endógenos y de tamaño creciente que se seleccionan en función del tamaño del YAC que se quiere introducir, pudiendo albergar un YAC con un tamaño desde las 150 kb hasta las 2 Mb. Para la transferencia del YAC APP-8 (clon B142F9) de 610 kb se seleccionó la cepa YLBW4, que deja un espacio entre dos cromosomas endógenos de 450 y 680 kb (**Figura R.3**).

Para la transferencia del YAC desde la cepa AB1380 a la cepa *window* YLBW4 se utilizó el método del *kar-crossing* (apartado 3.3.2); mediante el cual se obtuvieron un total de 21 colonias, denominadas B142F9W4, por transferirse desde el clon B142F9 y poseer genotipo YLBW4, capaces de crecer en el medio selectivo para el YAC y cicloheximida (SD –U –W + Cyh).

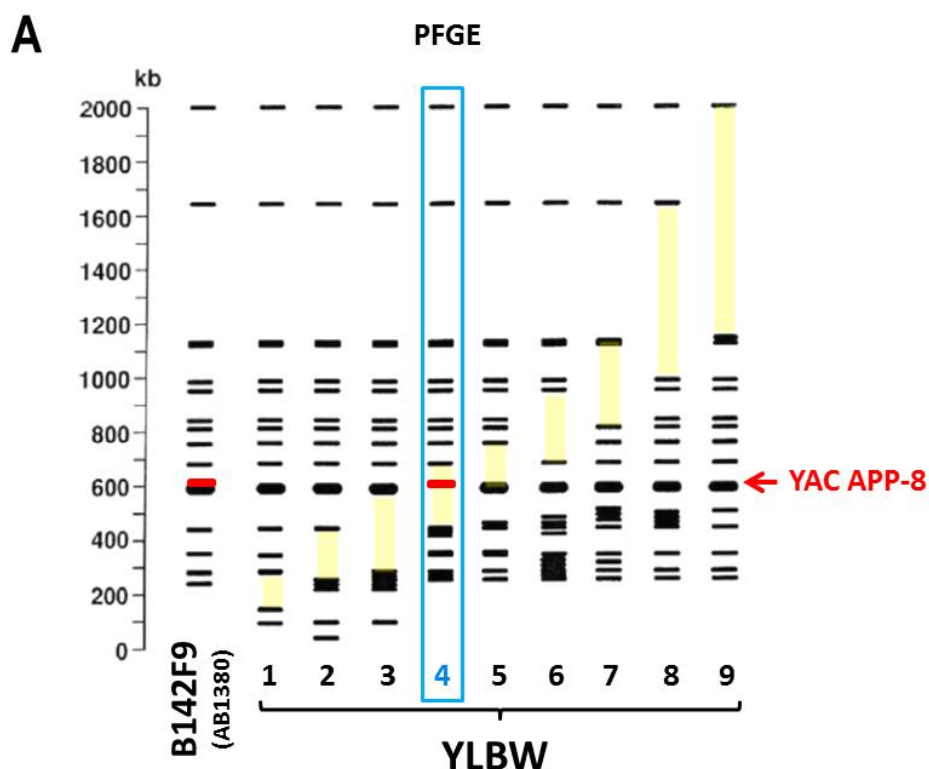


Figura R.3. Elección de la cepa YLBW4 para la transferencia del YAC APP-8 (clon B142F9) desde la cepa AB1380. Se representa un esquema de una PFGE en el que aparecen en negro los diferentes cromosomas endógenos de cada cepa de levadura y en rojo el YAC APP-8. El primer pocillo corresponde al clon B142F9, con genotipo AB1380, portador del YAC APP-8, en el que se puede observar que este YAC migra en la PFGE muy cercano a un cromosoma endógeno de dicha cepa. El resto de pocillos se corresponden a cepas de levaduras *window* (YLBW1-YLBW9) donde se representa en amarillo la zona electroforética libre de cromosomas endógenos característica de cada una de estas cepas. Para la transferencia del YAC APP-8 se seleccionó el YLBW4 debido a que el YAC APP-8 migraba dentro de su zona electroforética que comprendía desde las 450 kb hasta las 680 kb.

4.2.1.1 Análisis de los clones resultantes de la transferencia mediante PCR

Las 21 colonias obtenidas fueron analizadas mediante PCR analítica contra el locus *MAT* (cebadores en el apartado 3.2.2 y condiciones en el apartado 3.3.2), con el fin de distinguir entre células haploides *MAT* α (genotipo YLBW4, tamaño del fragmento amplificado de 404 pb), *MAT* α (genotipo AB1380, 544 pb), y diploides (ambos genotipos, 544 y 404 pb) (**Figura R.4A**). Finalmente 5 clones fueron considerados positivos para *MAT* α (genotipo YLBW4) y portadores del YAC APP-8 (clones B142F9W4-1, 2, 5, 6 y 9) (**Figura R.4B**).

La facilidad con la que puede emplearse la maquinaria de recombinación homóloga en levaduras también representa un peligro subyacente, obligando a la confirmación de la integridad y estructura del YAC tras cada uno de los pasos realizados (Giraldo, 2002).

Para el análisis de los 5 clones que resultaron positivos, se realizó una serie de PCRs para comprobar esta integridad del YAC, realizando así la PCR de los exones 1 y 6 del gen *APP*, de la

secuencia 2 que se encontraba a 107 kb del inicio del gen *APP*; y otra del gen *GABPA* situado a 110 kb del final del gen *APP*. De los 5 clones analizados, 4 fueron positivos para todas las PCRs (1, 5, 6 y 9) (**Figura R.4C**), lo cual indicaba que habían retenido, muy probablemente, la totalidad del YAC tras el proceso de transferencia desde la cepa original AB1380 a la cepa de destino YLBW4.

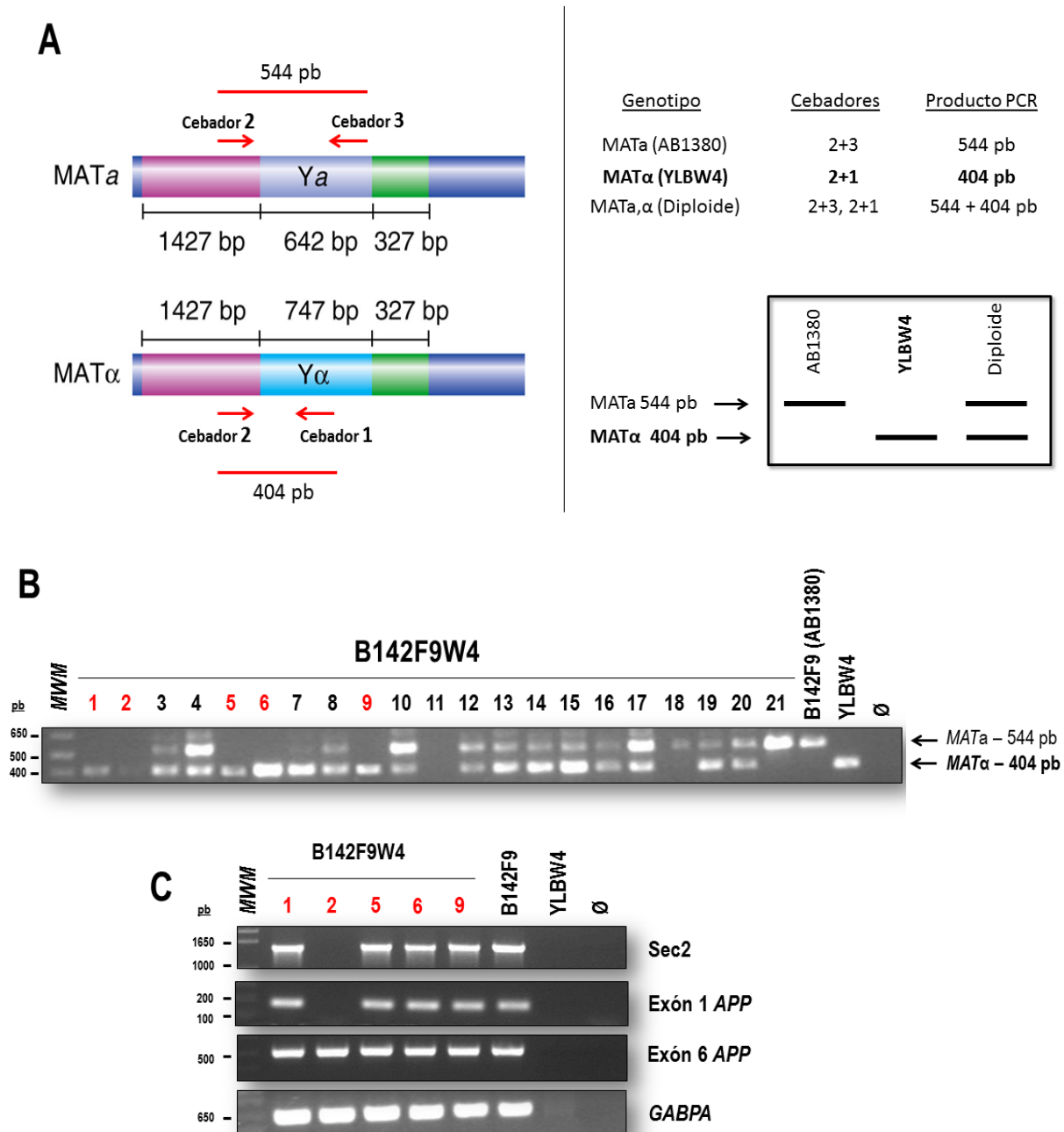


Figura R.4. Análisis por PCR de colonias obtenidas en el proceso de transferencia del YAC. (A) Esquema representativo del análisis por PCR del locus *MAT* en levaduras. Usando el cebador 2 (MAT2) común a ambos locus y un cebador propio del locus *MATa* [cebador 3 (MAT3)] o del locus *MATα* [cebador 1 (MAT1)] se puede discriminar entre cepas haploides con genotipo AB1380 (544 pb) e YLBW4 (404 pb); e incluso identificar células diploides con ambos genotipos (544 + 404 pb). (B) PCR del locus *MAT* de levadura para las 21 colonias crecidas en SD –U –W + Cyh. Las 5 colonias haploides con genotipo *MATα* (YLBW4) se encuentran marcadas en rojo. (C) PCR de secuencias alternas a lo largo del YAC para comprobar la integridad de éste en los 5 clones seleccionados. Los clones 1, 5, 6 y 9 fueron positivos para todas las PCRs. *MWM* – marcador de peso molecular; B142F9 – clon original portador del YAC APP-8 en la cepa de levadura AB1380; YLBW4 – cepa *window 4* original, Ø – control sin ADN.

4.2.1.2 Análisis de los clones B142F9W4 mediante PFGE y Southern blot

Para observar si alguno de los 5 clones seleccionados había sufrido pérdidas o reorganizaciones importantes en la región codificante del gen *APP*, se decidió realizar un *Southern blot* comparativo. Para ello, se digirió el ADN genómico de B142F9 y los diferentes clones de B142F9W4 con la enzima de restricción *BamH* I. Tras la electroforesis y transferencia a membrana, se hibridó usando una sonda del ADNc de la isoforma 695 del gen *APP*. Esta hibridación produce un patrón de bandas característico que corresponde a las distintas regiones codificantes del gen. Este patrón debería ser igual tanto para el clon original como para los clones seleccionados, siempre y cuando conserven correctamente la región codificante. Para obtener el patrón de digestión teórico de la enzima *BamH* I en el locus del gen *APP* se utilizó el programa *BioEdit*. Después se procedió a identificar los fragmentos que contenían alguna de las regiones codificantes del gen, lo que implicaba que esa banda debería aparecer marcada en la membrana. En la **Figura R.5** puede observarse el patrón teórico de este *Southern blot* y su coincidencia con la escalera de bandas obtenida para el clon original B142F9 y los clones B142F9W4-1, 5, 6 y 9. La conservación de este patrón de bandas entre estos clones indica que la región codificante no ha sufrido grandes modificaciones ni reordenamientos durante la transferencia del YAC APP-8 en estos clones, pero sí en el clon B142F9W4-2, el cuál ha sufrido la pérdida de su región codificante hasta el exón 5 del APP (el exón 6 es positivo mediante PCR).

A continuación los 5 clones seleccionados se separaron mediante PFGE. Se transfirió el gel a una membrana de nylon y se realizó un *Southern blot* de nuevo con la sonda del ADNc del gen *APP*, de manera que se hiciera más fácil la visualización del YAC. En la **Figura R.6A** puede verse el gel, tras la migración, tñido con BrEt, y posterior hibridación. Se observó que los clones B142F9W4-1, 6 y 9 portaban el YAC en su tamaño esperado de 610 kb, mostrando una transferencia eficaz del YAC APP-8 a la nueva cepa YLBW4; mientras que los clones 2 y 5 mostraban un descenso de tamaño, haciéndose más patente en el clon 2.

Finalmente se seleccionó el clon B142F9W4-6, del cual se realizó un nuevo PFGE y posterior transferencia e hibridación con la sonda del ADNc del gen *APP* (**Figura R.6B**). Esta PFGE se realizó junto a la cepa de levadura YLBW4 y la cepa AB1380 (carentes del YAC), el clon original B142F9, portador del YAC APP-8 y un marcador de peso molecular de *S.cerevisiae*.

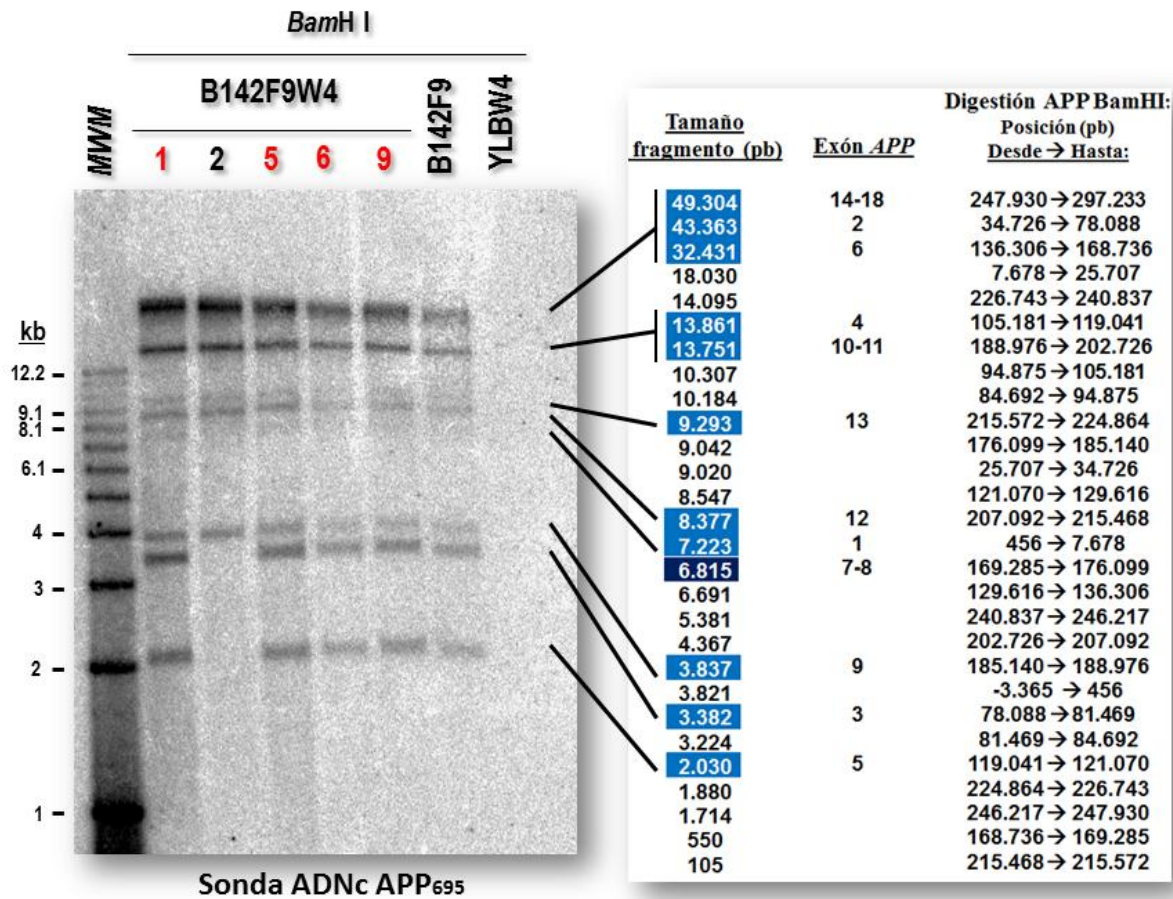


Figura R.5. Análisis por *Southern blot* comparativo del clon B142F9 y clones B142F9W4. Se digirió con la enzima de restricción *BamH I* el ADN genómico del clon B142F9 (control positivo), de la levadura YLBW4 (control negativo) y de los clones B142F9W4 a analizar. Se separaron en un gel de agarosa, se transfirieron a una membrana de nylon y finalmente se hibridaron con la sonda ADNc de la isoforma 695 del gen *APP*. A la derecha se puede ver el patrón de bandas teórico que se obtiene tras digerir el locus del gen *APP* con *BamH I*, en azul aparecen marcados los fragmentos que contienen alguna región codificante del gen y a su derecha el exón que alberga ese fragmento. El fragmento marcado con azul oscuro alberga los exones 7 y 8, pero no hibrida porque la sonda es del ADNc de la isoforma 695, la cual sufre el procesamiento por *splicing* alternativo de estos exones. A la izquierda, el patrón obtenido tras el *Southern blot* y su coincidencia con el patrón de bandas teórico para los clones B142F9 y B142F9W4-1, 5, 6 y 9 (en rojo). Se puede apreciar que el clon B142F9W4-2 ha sufrido la pérdida de su región codificante hasta al menos el exón 5. *MWM* – marcador de peso molecular marcado radiactivamente; B142F9 – clon original portador del YAC APP-8 en la cepa de levadura AB1380; YLBW4 – cepa *window 4* original.

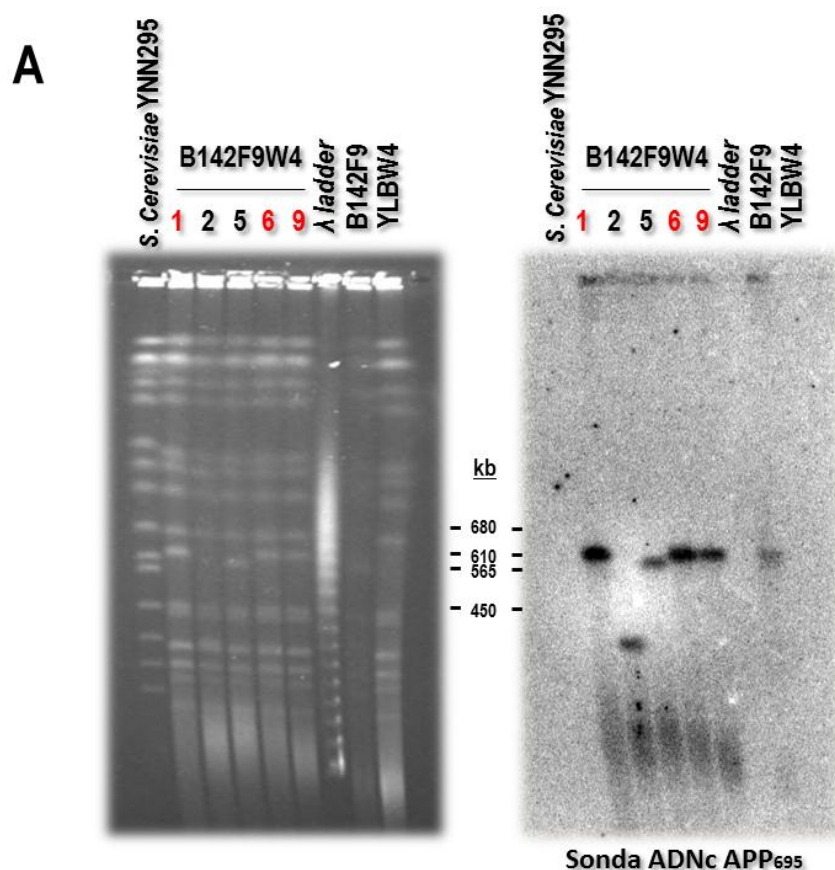
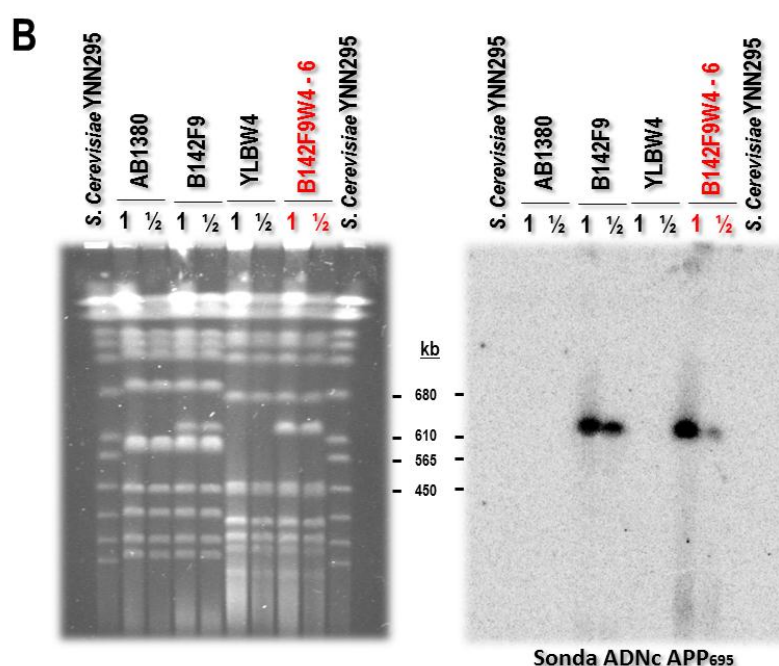


Figura R.6. Separación de cromosomas de levaduras mediante PFGE y posterior *Southern blot*. (A) Análisis de los 5 clones B142F9W4. A la izquierda PFGE teñido con BrEt. A la derecha membrana hibridada con ADNc del gen APP. Los clones B142F9W4-1, 6 y 9 (en rojo) presentan el YAC APP-8 con su tamaño esperado, proveniente del clon B142F9.



(B) Fracciones 1 y 1/2 de bloques de agarosa con el clon B142F9W4-6 (en rojo) seleccionado, clon B142F9 con genotipo AB1380 portador del YAC y cepas AB1380 e YLBW4 carentes de YAC. *S. cerevisiae* YNN295 – marcador estándar de peso molecular. λ ladder – marcador de peso molecular de concatémeros del fago λ .

4.2.2 PRIMERA RECOMBINACIÓN: INTRODUCCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A NEOMICINA EN EL BRAZO URA

La recombinación homóloga se produce en células de levadura de forma natural y eficaz, contribuyendo a la integración en su genoma de secuencias de ADN en base a su homología (Hinnen et al., 1978; Botstein & Fink, 1988). Durante años se han usado secuencias manipuladas *in vitro* para la modificación de genes de levadura, observándose que las cadenas de ADN linealizado muestran una gran capacidad recombinogénica en levaduras; capacidad que se eleva varios órdenes de magnitud mediante el uso de secuencias homólogas del genoma de las levaduras (Orr-Weaver et al., 1981; Orr-Weaver & Szostak, 1983a). Siguiendo estas premisas, se decidió usar el vector pRV1 de 12.5 kb (Srivastava & Schlessinger, 1991) por tres motivos:

- 1) Inactivar el gen *ura3* para poder usarlo posteriormente.
- 2) Introducir un nuevo marcador auxotrófico: *lys2*.
- 3) Incluir el gen de resistencia a neomicina (*neo*) para poder ser usado como selección, posteriormente, en células animales.

El plásmido pRV1 se digiere con la enzima de restricción *Hind* III, produciendo dos moléculas lineales de 9.5 y 3 kb. Se procede a la purificación en gel de agarosa de la banda de 9.5 kb, la cual contiene el gen de selección auxotrófico *lys2* y el gen *neo*, que se encuentran entre dos secuencias de aproximadamente 500 pb del gen *ura3* de levaduras, situadas en ambos extremos, lo que permite la integración por recombinación homóloga en el brazo Ura del YAC APP-8 (**Figura R.7**),

Para la realización de esta recombinación se ha utilizado el método del AcLi (Ito et al., 1983) descrito en el apartado 3.3.3.1. Mediante la transformación del clon competente B142F9W4-6 con 600 ng del pRV1 lineal, se obtuvieron un total de 6 colonias, denominadas APPneoW4, por contener el nuevo YAC APPneo (YAC APP-8 con el gen *neo*) y poseer genotipo YLBW4, capaces de crecer en el medio selectivo para el nuevo YAC (SD –K –W, medio sin lisina ni triptófano) y 5-FOA (inhibe el crecimiento de células que conserven el marcador *ura3*). En el caso de que el proceso de recombinación haya ocurrido de forma satisfactoria, las colonias deberían ser capaces de crecer en medio SD –K –W al haber incorporado el gen *lys2*, y en presencia de 5-FOA (marcador de selección negativo) porque deberían haber perdido el marcador *ura3*.

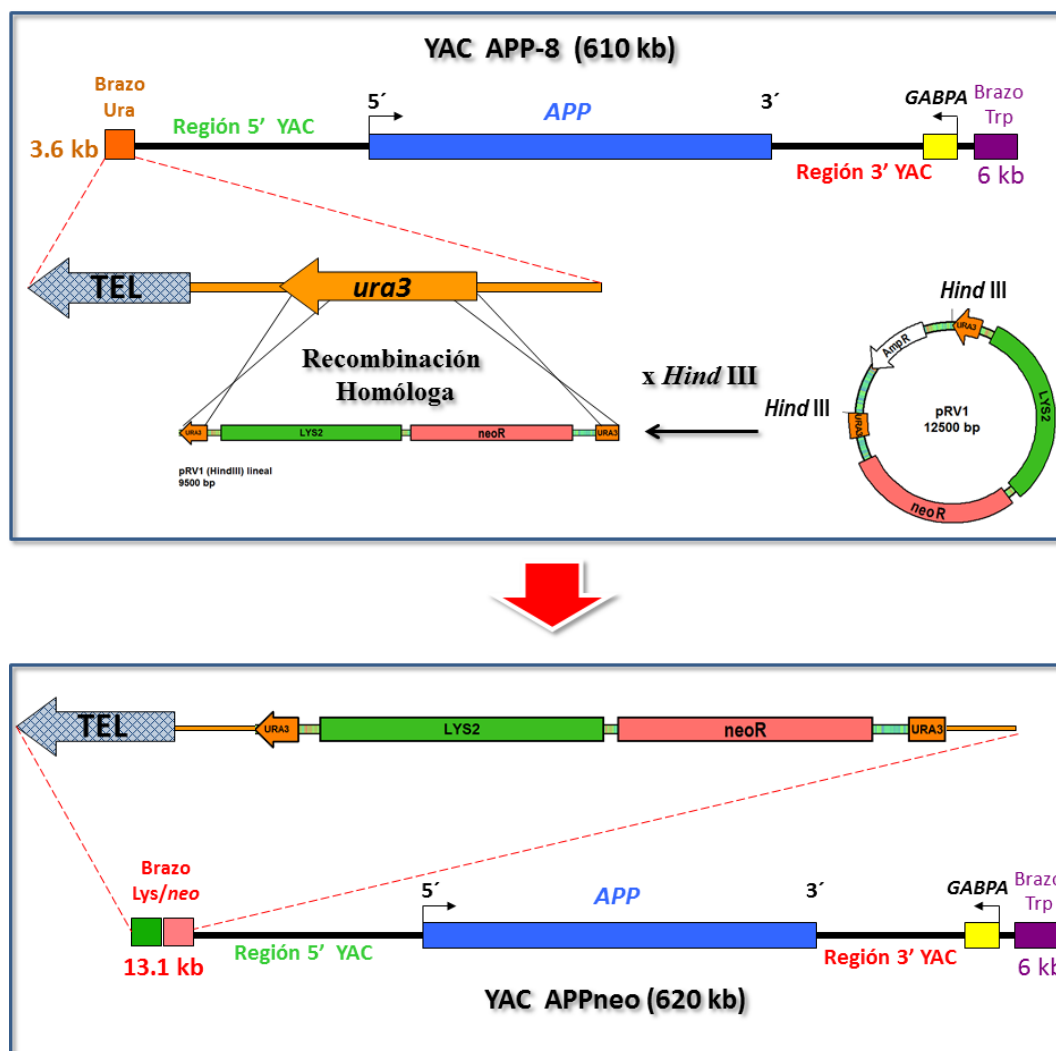


Figura R.7. Esquema de integración por recombinación homóloga de pRV1 lineal en el brazo Ura del YAC APP-8. El plásmido pRV1 se digiere con la enzima de restricción *Hind* III, liberándose una molécula de ADN lineal de 9.5 kb. Esta molécula se integra, mediante recombinación homóloga, en el gen *ura3* del brazo corto del YAC APP-8 de 610 kb, truncándose así su secuencia. Gracias a esta recombinación se produce la incorporación en el YAC del gen *neo* y un nuevo marcador de selección en levaduras como es *LYS2*, generándose finalmente el YAC APPneo de 620 kb. El tamaño del plásmido no se representa a escala.

4.2.2.1 Análisis de los clones resultantes de la primera recombinación homóloga mediante PCR

Para el análisis de los clones obtenidos mediante esta recombinación homóloga, se realizó una primera PCR del gen *neo*, que debería haberse incorporado tras el proceso de recombinación. Como control positivo se utilizó ADN de pRV1 lineal con el que se había realizado la recombinación y como control negativo se utilizó el clon B142F9W4-6. De las 6 colonias analizadas, 5 fueron positivas para esta PCR. (APPneoW4 1, 2, 3, 4 y 6) (**Figura R.8A**). La siguiente PCR fue diseñada para comprobar el entorno de recombinación, si la secuencia de 9.5 kb de pRV1 se había incorporado en el lugar

correcto. Para ello, se utilizó un cebador localizado dentro del gen *ura3*, y un cebador propio de la secuencia del plásmido pYAC4, de tal forma que es capaz de amplificar un fragmento de 1150 pb en el YAC APP-8, pero incapaz para amplificar las más de 10 kb en el YAC APPneo, debido a que entre medias se ha incorporado la secuencia de 9.5 kb de pRV1. Esta PCR mostró que los 5 clones analizados eran negativos para esta PCR. (**Figura R.8A**)

El análisis de estos clones se completó mediante el uso de una serie de PCRs que podían aportar más información sobre la integridad de la secuencia humana en el YAC. Por ello, se realizaron PCRs para comprobar la región codificante del gen *APP*, analizando los exones 1, 6, y 12-13 de dicho gen, y de regiones colindantes como son la secuencia 1 y 2 en la región 5' y *GABPA* en la región 3' del YAC. Para todas estas PCRs se utilizó como control positivo el clon B142F9W4-6 y como control negativo YLBW4. Los 5 clones analizados salieron positivos para todas las PCRs (**Figura R.8B**). Este experimento ilustra bien la altísima eficiencia del proceso de recombinación homóloga en levaduras: de las 6 colonias obtenidas y analizadas se obtuvieron 5 positivas (83%).

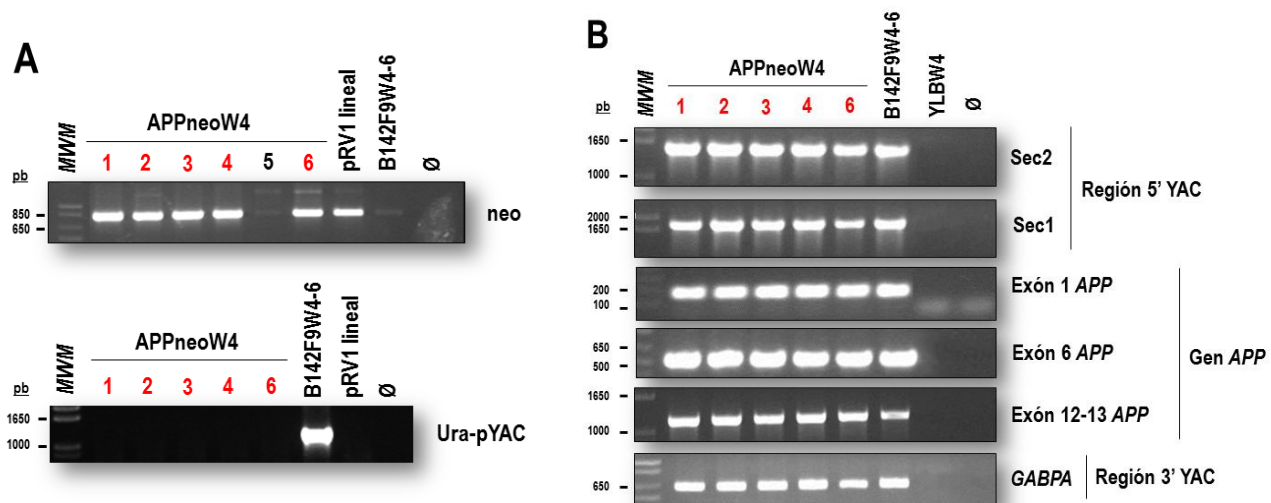


Figura R.8. Análisis por PCR de colonias obtenidas en la primera recombinación homóloga. (A) Arriba: PCR del gen *neo* para las 6 colonias crecidas en SD –K –W + 5-FOA. Las 5 colonias positivas para este gen se encuentran marcadas en rojo. Abajo: PCR de análisis del entorno de recombinación. En el caso de no haberse producido la interrupción del gen *ura3*, debería producirse la amplificación de un fragmento de 1150 pb (observado en el clon B142F9W4-6, portador del YAC APP-8). Los 5 clones analizados salieron negativos para esta PCR, lo que sugería que la secuencia de 9.5 kb se había integrado en el lugar correcto. (B) PCR de secuencias alternas a lo largo del YAC para comprobar la integridad de éste en los 5 clones seleccionados. Todos los clones fueron positivos para todas las PCRs. MWM – marcador de peso molecular; B142F9W4-6 –clon portador del YAC APP-8 en la cepa de levadura YLBW4; YLBW4 –cepa *window 4* original sin YAC; pRV1 lineal – ADN del plásmido digerido de 9.5 kb con el que se realizó la transformación; Ø – control sin ADN.

4.2.2.2 Análisis de los clones APPneoW4 mediante PFGE y Southern blot

Se realizó un nuevo *Southern blot* comparativo de los 5 clones positivos. Se digirió el ADN genómico de B142F9 y los clones APPneoW4 con la enzima de restricción *BamH* I. Tras la electroforesis y transferencia a membrana, se hibridó usando una sonda del ADNc de la isoforma 695 del gen *APP* siguiendo un proceso equivalente al descrito en el apartado 4.2.1.2. En su posterior revelado se observó que el patrón teórico coincidía con la escalera de bandas obtenida para el clon original B142F9 y los clones APPneoW4-1, 2, 3, 4 y 6 (**Figura R.9**). La conservación de este patrón de bandas entre estos clones indica que la región codificante no ha sufrido grandes modificaciones ni reordenamientos durante esta primera recombinación homóloga.

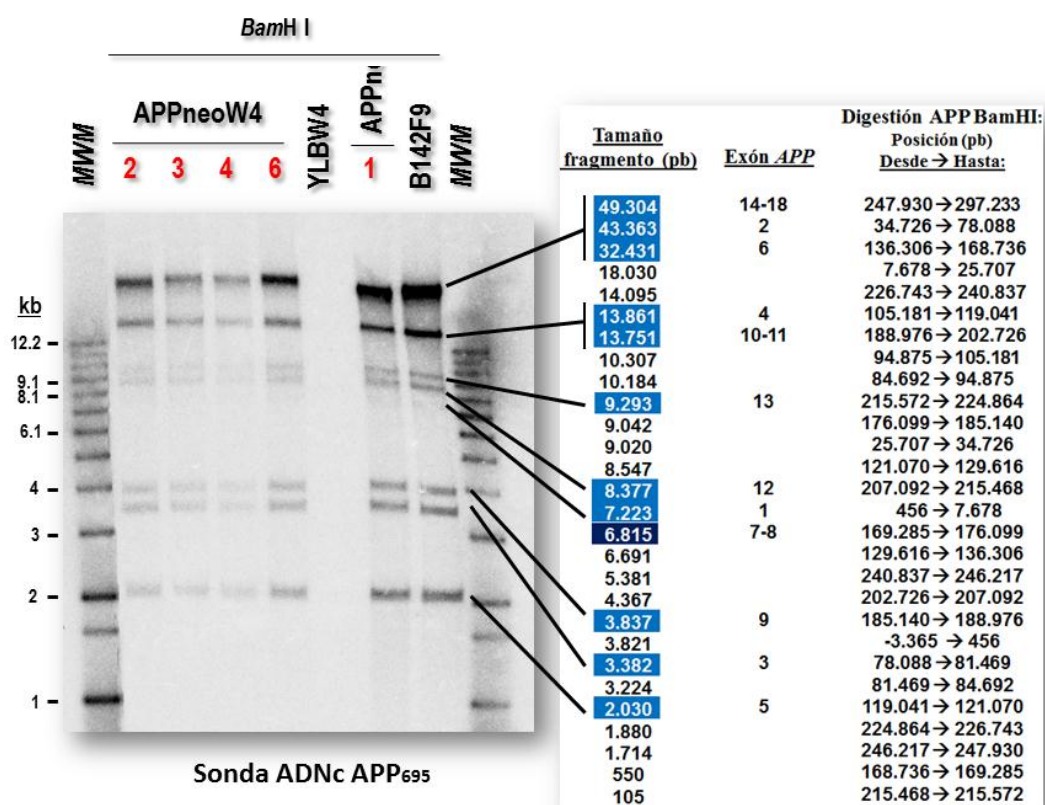


Figura R.9. Análisis por *Southern blot* comparativo del clon B142F9 y clones APPneoW4. Se digirió con la enzima de restricción *BamH* I el ADN genómico del clon B142F9 (control positivo), de la levadura YLBW4 (control negativo) y de los clones APPneoW4 a analizar. Se separaron en un gel de agarosa, se transfirieron a una membrana de nylon y finalmente se hibridaron con la sonda ADNc de la isoforma 695 del gen *APP*. A la derecha se puede ver el patrón de bandas teórico que se obtiene tras digerir el locus del gen *APP* con *BamH* I, en azul aparecen marcados los fragmentos que contienen alguna región codificante del gen y a su derecha el exón que alberga ese fragmento. El fragmento marcado con azul oscuro alberga los exones 7 y 8, pero no hibrida porque la sonda es del ADNc de la isoforma 695, la cual sufre el procesamiento por *splicing* alternativo de estos exones. A la izquierda, el patrón obtenido tras el *Southern blot* y su coincidencia con el patrón de bandas teórico para los clones B142F9 y APPneoW4-1, 2, 3, 4 y 6 (en rojo). *MWM* – marcador de peso molecular marcado radiactivamente; B142F9 – clon original portador del YAC APP-8 en la cepa de levadura AB1380; YLBW4 – cepa *window 4* original.

Adicionalmente, los 6 clones obtenidos tras la recombinación se separaron mediante PFGE. Se transfirió el gel a una membrana de nylon y se realizó un *Southern blot* utilizando esta vez la sonda del gen *neo*, de manera que si la recombinación homóloga había sucedido de forma satisfactoria, hibridaría esta sonda con la región correspondiente al YAC. En la **Figura R.10** puede verse el gel tras la migración, teñido con BrEt, y posterior hibridación. Se observó que los clones APPneoW4-1, 2, 3, 4 y 6 portaban el YAC APPneo con las aproximadamente 10 kb de incremento de tamaño esperado, en comparación al YAC APP-8 del clon B142F9W4-6 (620 y 610 kb respectivamente). También se puede observar que el clon APPneoW4-5 no ha incorporado el gen *neo* en su genoma y además ha sufrido, durante este proceso de recombinación homóloga, una serie de reordenamientos en sus cromosomas endógenos, corroborando la importancia del análisis de la integridad y estructura de todos los clones tras cada uno de los pasos de recombinación realizados.

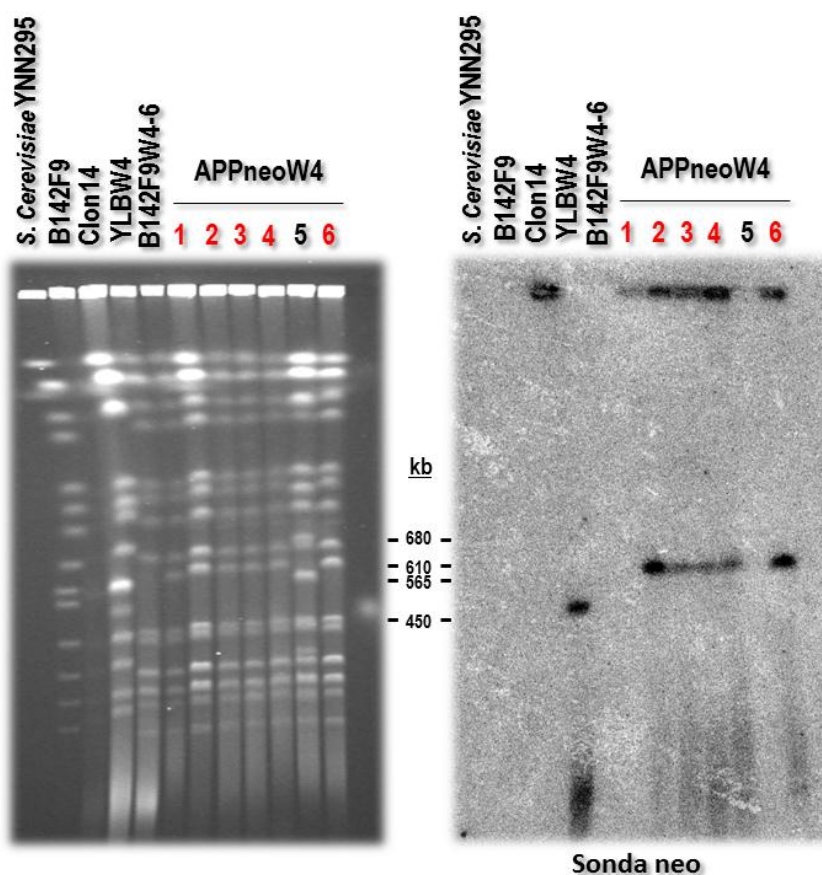


Figura R.10. Separación de cromosomas de levaduras tras la primera recombinación mediante PFGE y posterior *Southern blot*. Análisis de los 6 clones APPneoW4. A la izquierda PFGE teñido con BrEt en el que puede observarse el incremento de tamaño esperado del YAC, hasta las 620 kb, en los nuevos clones APPneoW4-1, 2, 3, 4 y 6 (en rojo) tras el proceso de recombinación, en comparación al del clon B142F9W4-6 de 610 kb. A la derecha membrana hibridada con sonda *neo*. Los clones que presentaban el incremento de tamaño, han incorporado el gen *neo* en dicho YAC, generándose así el nuevo YAC APPneo. En el clon APPneoW4-5 se puede observar la serie de reordenamientos sufridos por sus cromosomas endógenos. El clon 14 corresponde a una levadura de la cepa AB1380 portador de un YAC de 550 kb que contiene el gen *neo*. La hibridación observada en la parte inferior del carril de este clon es debido a la degradación parcial de este ADN, que había sido preparado hace algún tiempo. *S.cerevisiae* YNN295 – marcador estándar de peso molecular. Clon14 – Control positivo de hibridación.

4.2.3 SEGUNDA RECOMBINACIÓN: ELIMINACIÓN DEL GEN GABPA

La eliminación del gen *GABPA* situado en la región 3' del YAC APPneo se llevó a cabo mediante un nuevo paso de recombinación homóloga en levaduras. Esta vez se realizó mediante fragmentación cromosómica, proceso por el cual se puede romper un cromosoma en una secuencia determinada por transformación con un vector de recombinación lineal, el cual debe contener en un extremo una secuencia de ADN homóloga al cromosoma y en el otro extremo un elemento telomérico (Vollrath et al., 1988; Gerring et al., 1991; Schedl et al., 1993a; 1993b; Montoliu et al., 1996).

4.2.3.1 Estudio de las regiones repetitivas y elección de secuencias de homología

A la hora de elegir la secuencia de ADN homóloga para el proceso de recombinación hay que tener en cuenta principalmente dos aspectos: el tamaño, que se considera conveniente que esté entre 1 y 2 kb (Orr-Weaver & Szostak, 1983b; Pavan et al., 1990a; Adams et al., 1997) aunque secuencias a partir de 250 pb pueden funcionar perfectamente (Giraldo, 2002); y su condición de secuencia de ADN única, ya que casi la mitad del genoma de mamíferos (45-48%) está compuesto por secuencias repetitivas localizadas a lo largo del mismo (Lander et al., 2001) y por lo tanto pueden coexistir varias de estas secuencias a lo largo del YAC. Si se procediera a la elección de alguna de estas secuencias repetitivas como secuencias de homología para el proceso de recombinación homóloga, se ignoraría en cual de sus múltiples localizaciones se ha producido el proceso de recombinación. Por lo tanto, la elección de una secuencia única en una región determinada del genoma evitaría que la recombinación se diera en lugares no deseados.

Para localizar secuencias repetitivas en la región 3' del YAC se utilizó el programa bioinformático *RepeatMasker*. Tras dicho análisis, se eliminaron las secuencias repetitivas y se seleccionaron dos secuencias que tenían alrededor de 1.5 y 2 kb, denominadas secuencia A y secuencia B respectivamente, y que se encuentran situadas a 90 y 110 kb del final del gen *APP* y antes del final del gen *GABPA* (Figura R.2C).

Una vez seleccionadas estas secuencias para el proceso de recombinación, se diseñaron unos cebadores para su clonaje (Tabla MM.4), amplificando, mediante PCR a partir de ADN del clon B142F9, un fragmento de 1475 pb para esta SecA y de 2288 pb para la SecB. A estos cebadores se les añadieron unos nucleótidos extra en su posición 5', que contenían dianas de corte para la enzima de restricción *EcoR* I en un cebador y *BamH* I en el otro, con el fin de facilitar su introducción en el plásmido de recombinación.

Se procedió a un análisis de homología de secuencia con el programa *MacVector* para corroborar que las secuencias seleccionadas son únicas del YAC. Se realizó una matriz de homología de secuencia entre la SecA, la SecB y toda la estructura del YAC APP-8. Se pudo comprobar que la SecB presentaba un alto grado de similitud de secuencias respecto al YAC, a lo largo de toda la SecB (**Figura R.11B**), por lo que se procedió al descarte de esta SecB como secuencia de recombinación. Sin embargo, se observó que la SecA presentaba un grado alto de similitud de secuencias comprendidas únicamente entre las 200 y 350 pares de bases respecto al YAC (**Figura R.11A**). Por ello se decidió que a la hora de hacer lineal el vector de recombinación, se utilizará la enzima de restricción *BbvC* I, que corta después de los 350 pb (posición 421) de la SecA, con el fin de eliminar esta región repetitiva para el proceso de recombinación.

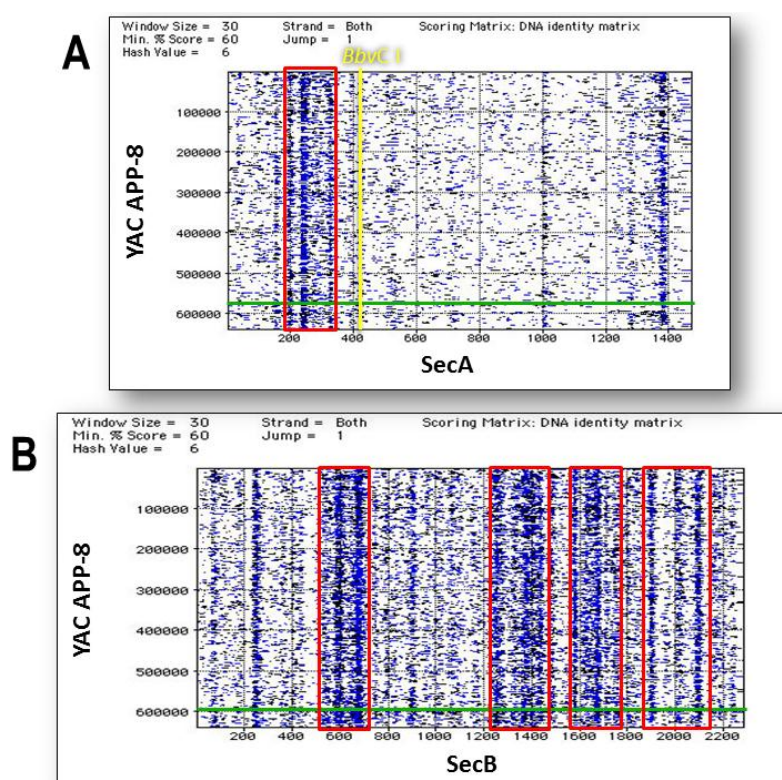


Figura R.11. Matrices de homología de secuencia de la SecA, SecB y el YAC APP-8 (*MacVector*). En la matriz se representa en azul la homología entre las dos secuencias a analizar, señalándose con un cuadro rojo donde se encuentra un alto grado de similitud de secuencias. La línea verde indica la situación exacta de la SecA y SecB en el YAC. (A) Eje Y: aproximadamente las 610 kb del YAC APP-8. Eje X: las 1475 pb de la SecA. Se puede apreciar un alto grado de similitud de secuencias entre las 200 y 350 pb. La línea amarilla indica la posición exacta (421) de corte por la enzima *BbvC* I. (B) Eje Y: aproximadamente las 610 kb del YAC APP-8. Eje X: las 2288 pb de la SecB. Se puede apreciar un alto grado de similitud de secuencias prácticamente a lo largo de toda la SecB.

4.2.3.2 Generación del vector de recombinación pYAC4'-SecA-Leu

Para la generación del vector de recombinación se partió del plásmido pYAC4 (11.5 kb) (Burke & Olson, 1991; Burke et al., 1992; Kuhn & Ludwig, 1994) (**Figura R.12**). Dicho plásmido se digirió con las enzimas de restricción *EcoR* I y *BamH* I, generándose 3 fragmentos: 1768, 3683 y 6003 pb. Se procedió a la purificación del fragmento de 6003 pb por ser el fragmento que contenía el brazo largo del YAC (situado en el extremo 3') que contiene el marcador de auxotrofia *trp1*, la ARS, un centrómero

y un elemento telomérico. A continuación se procedió a la purificación del producto de PCR de SecA, y se digirió igualmente con *EcoR* I y *BamH* I, que como se mencionó anteriormente, los productos de PCR tenían incorporadas las dianas de corte para ambas enzimas de restricción en ambos extremos, con el fin de facilitar su introducción y orientación adecuada en el vector de recombinación. Mediante el uso de la enzima T4 ADN ligasa se ligó la SecA con extremos cohesivos de *BamH* I y *EcoR* I con las 6003 pb del pYAC4 con corte *BamH* I y *EcoR* I, generándose el vector pYAC4'-SecA (7.5 kb) (**Figura R.12**).

Para que el vector se pudiera utilizar en esta nueva recombinación homóloga, era necesaria la presencia de un nuevo marcador auxotrófico. Para ello se extrajo el gen *leu2* del plásmido YDp-L (Berben et al., 1991) usando la enzima de restricción *BamH* I y se procedió a la generación de extremos romos usando la enzima T4 ADN polimerasa. Se hizo lineal el vector pYAC4'-SecA cortando con la enzima *EcoR* I y también se hicieron romos sus extremos para el correcto clonaje. De nuevo mediante la T4 ADN ligasa, se introdujo el gen *leu2* en el vector, generándose el plásmido final de recombinación pYAC4'-SecA-Leu. Se comprobó posteriormente, mediante digestión enzimática, la orientación del gen *leu2* en el vector.

Una vez obtenido el plásmido pYAC4'-SecA-Leu, se hizo lineal mediante el uso de las enzimas *BamH* I y *BbvC* I para su correcto uso en el paso de recombinación del YAC APPneo. El esquema de la generación y linealización del plásmido de recombinación pYAC4'-SecA-Leu se muestra en la **Figura R.12**.

4.2.3.3 Recombinación homóloga en el YAC APPneo

La recombinación homóloga en la región 3', para la eliminación del gen *GABPA*, se realizó sobre el YAC modificado tras la primera recombinación, el YAC APPneo. Para ello se seleccionó el clon APPneoW4-1 y a partir de él se prepararon levaduras competentes para utilizar en la transformación. Se utilizó el vector de recombinación pYAC4'-SecA-Leu. Este plásmido se corta con las enzimas de restricción *BamH* I y *BbvC* I, produciendo dos moléculas lineales: una de 0.4 kb, que contiene la región de SecA que presenta un alto grado de homología de secuencia con el YAC (**Figura R.11A**); y otro de 8.7 kb, que contiene, en un extremo, aproximadamente 1 kb de la secuencia de recombinación (SecA) de secuencia única; en el otro extremo el telómero y en medio el ARS, el centrómero y los marcadores de selección *trp1* y *leu2* (**Figura R.12**). Se procede a la purificación en gel de agarosa de la banda de 8.7 kb para posteriormente usar en la transformación. Tras este nuevo paso de recombinación homóloga, esquematizado en la **Figura R.13**, se eliminaron 57 kb de la región

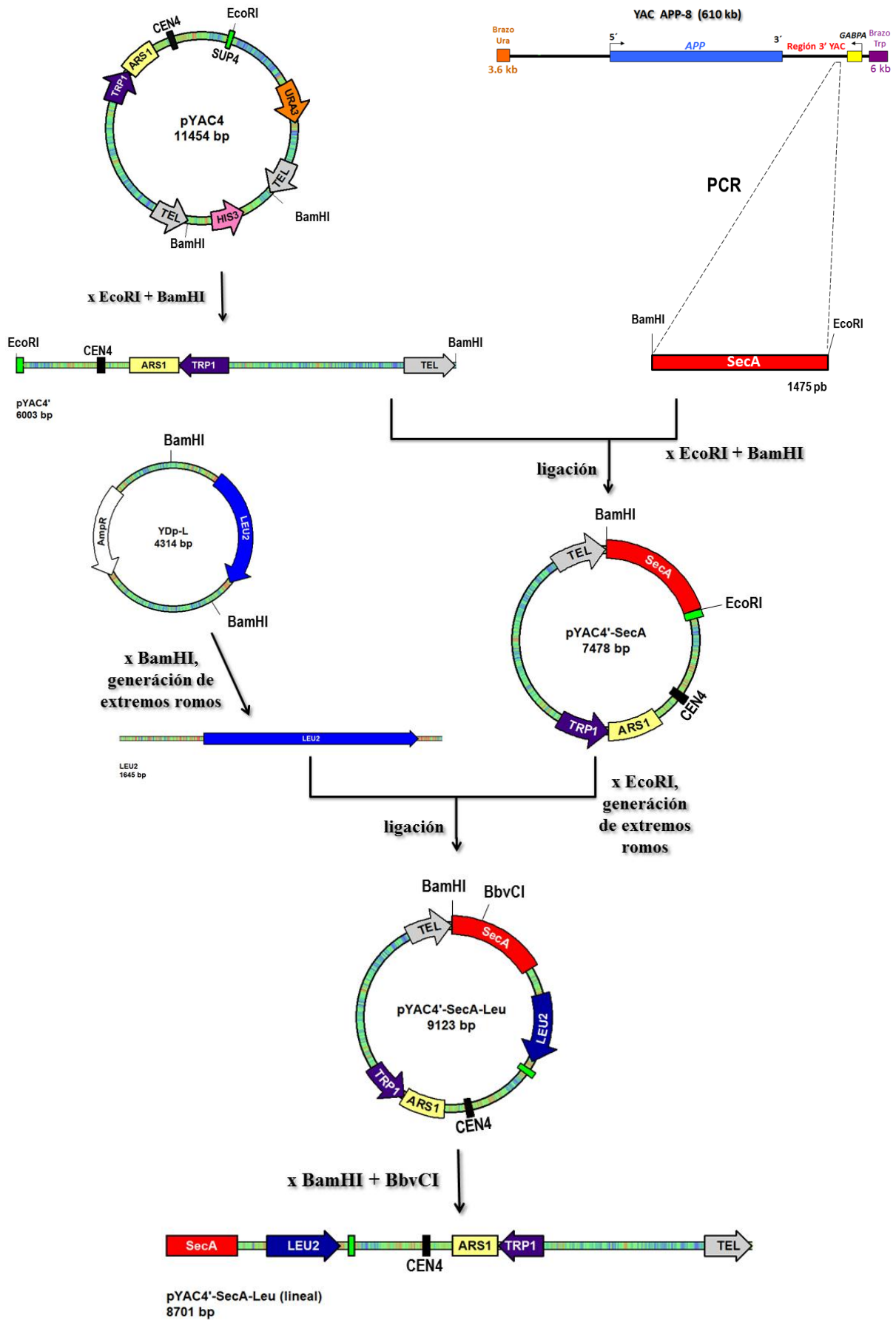


Figura R.12. Esquema de la generación del plásmido de recombinación pYAC4'-SecA-Leu y su posterior linealización.

3' del YAC, entre las cuales se encuentra la totalidad de la secuencia del gen *GABPA*. De esta forma se obtuvo el YAC APPwt, denominado así por contener únicamente el gen *APP* silvestre (wt, del inglés *wild type*).

Mediante la transformación por el método del AcLi del clon competente APPneoW4-1 con 600 ng de pYAC4'-SecA-Leu lineal de 8.7 kb, se obtuvieron un total de 122 colonias capaces de crecer en el medio selectivo para el nuevo YAC (SD -K -W -L, medio sin lisina, triptófano y leucina). Se seleccionaron un total de 50 colonias, denominadas W4c1-W4c50.

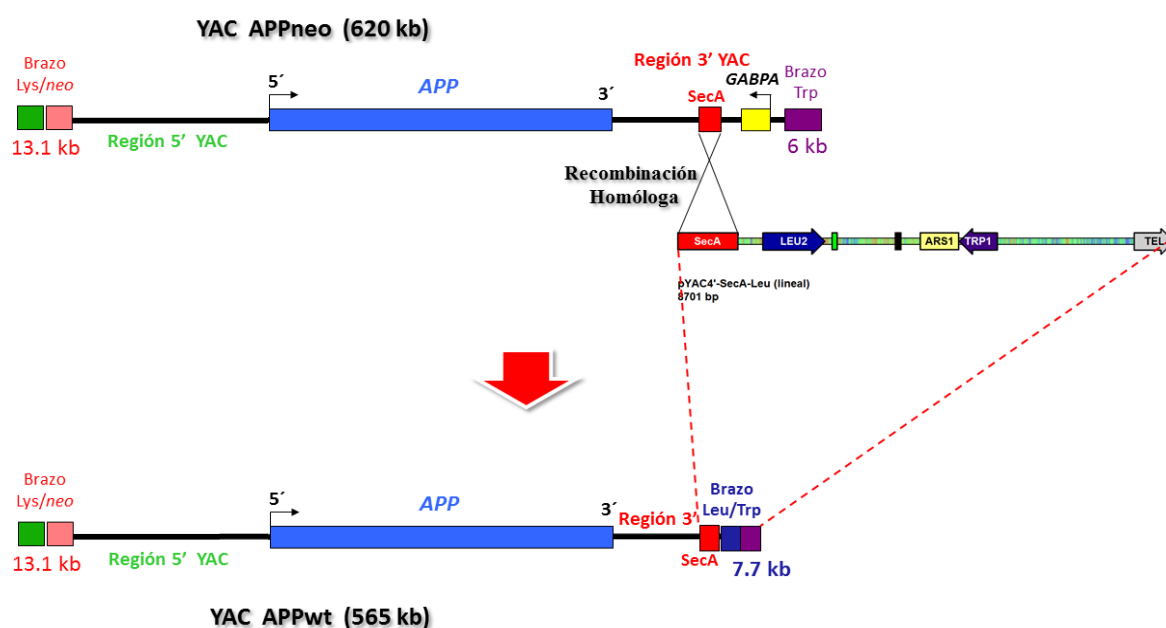


Figura R.13. Esquema previsto para la fragmentación del YAC APPneo mediante recombinação homóloga. En el proceso de fragmentación se eliminan 63 kb (57 kb de secuencia humana + 6 kb del brazo largo del YAC) de la región 3' del YAC, incluyendo al gen *GABPA*, y se reemplaza por un nuevo brazo largo de 7.7 kb con nuevos marcadores de selección (pYAC4'-SecA-Leu lineal), generándose finalmente el YAC APPwt de 565 kb. El tamaño del plásmido no se representa a escala.

4.2.3.4 Análisis de los clones seleccionados en la segunda recombinação homóloga mediante PCR

Como primer análisis de los 50 clones seleccionados, se realizaron dos PCRs, una para el exón 6 del gen *APP* (comprobando así la presencia del YAC) y otra para el gen *GABPA*, la cual debería ser negativa si la fragmentación había ocurrido de forma adecuada. En la **Figura R.14** se pueden observar estas PCRs sobre los primeros clones analizados. Como control positivo para ambas PCRs se utilizó el clon APPneoW4-1 y como control negativo se utilizó la levadura YLBW4 carente de YAC. De las 50 colonias analizadas, 11 se comportan como candidatos para su estudio posterior, los clones

W4c1, 2, 5, 11, 19, 23, 26, 38, 41, 47 y 49. En todos ellos la PCR del exón 6 del gen *APP* es positiva y la de *GABPA* es negativa.

Para continuar con el análisis de estos 11 clones, se diseñó una PCR híbrida, caracterizada porque uno de los cebadores se encuentra situado en el plásmido de recombinación pYAC4'-SecA-Leu, en una región que no se encuentra en el YAC, mientras que el otro cebador se encuentra localizado en el YAC, en la región adyacente a la de recombinación. Así, sólo se puede producir la amplificación del fragmento cuando la recombinación haya sucedido en el lugar esperado. De las 11 colonias analizadas, 5 fueron positivas para esta PCR híbrida: W4c11, W4c19, W4c26, W4c38 y W4c49 (**Figura R.15A**).

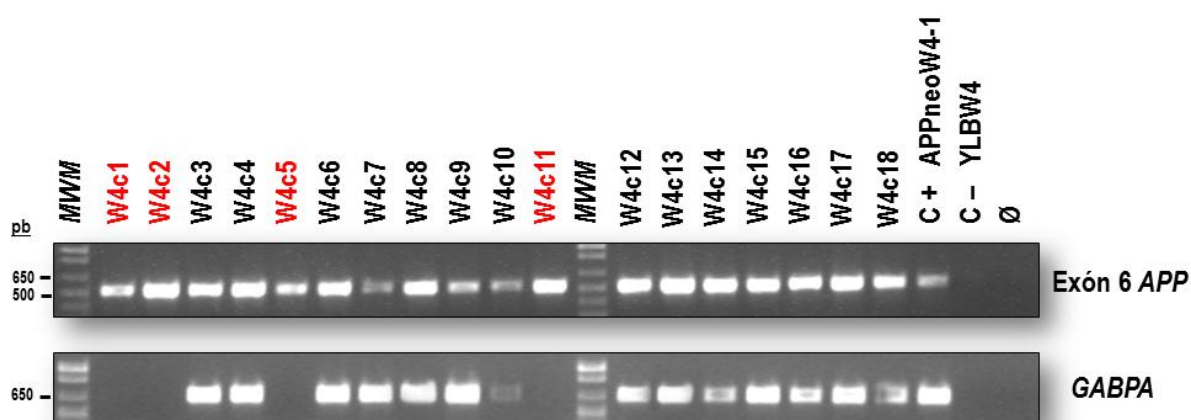


Figura R.14. Análisis por PCR de colonias seleccionadas en la segunda recombinación homóloga. PCR realizada a los primeros 18 clones seleccionados. La primera PCR se realizó sobre el exón 6 del gen *APP*, siendo todos positivos, y la segunda PCR se realizó sobre el gen *GABPA*. Los clones positivos para la primera PCR y negativa para la segunda vienen marcados en rojo. *MWM* – marcador de peso molecular; C + APPneoW4-1 – control positivo, clon portador del YAC APPneo en la cepa de levadura YLBW4; C – YLBW4 – control negativo, cepa *window 4* original sin YAC; Ø – control sin ADN.

El análisis de estos 5 clones se completó mediante el uso de otras cinco PCRs que podían aportar más información sobre la estructura de los mismos: gen *neo*, situado en el brazo 5' del YAC; *Sec2*, situada en la región 5' del YAC, exón 12-13 del gen *APP*; *SecA'*, situada en la región 3' antes de la región utilizada para la recombinación; y finalmente una PCR de la secuencia de ADN *SecB*, que está más allá de la zona de recombinación, y por lo tanto debería ser negativa (**Figura R.15B**). Los 5 clones mostraron el patrón de bandas esperado.

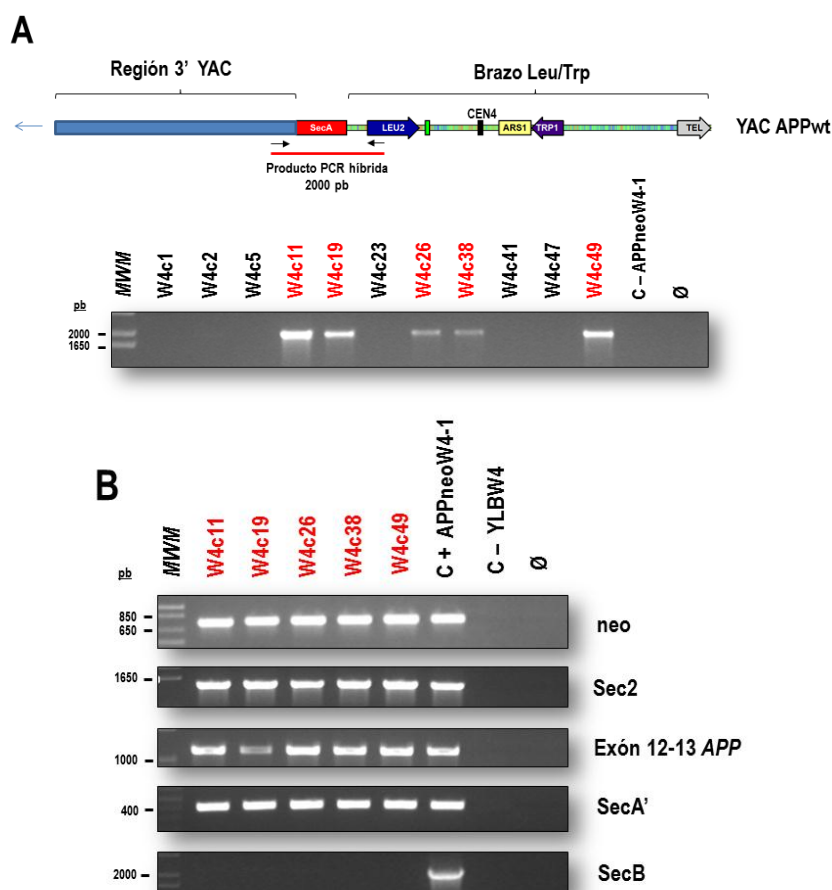


Figura R.15. Análisis por PCR de colonias positivas de la segunda recombinación homóloga. (A) Arriba: Diseño de la PCR híbrida. Abajo: PCR híbrida de las 11 colonias seleccionadas. En rojo se marcan las 5 colonias que han sido positivas para esta PCR híbrida. (B) Análisis de diferentes secuencias a lo largo del YAC de los 5 clones positivos para la PCR híbrida. Fueron positivos para todas las PCR a lo largo del YAC y negativos para SecB, que debería haberse perdido tras una correcta recombinación. *MWM* – marcador de peso molecular; *C+*; APPneoW4-1 – control positivo, clon portador del YAC APPneo en la cepa de levadura YLBW4; *C-* YLBW4 – control negativo, cepa *window 4* original sin YAC; Ø – control sin ADN.

4.2.3.5 Análisis de los 5 clones positivos mediante PFGE y *Southern blot*

4.2.3.5.1 Determinación de la fragmentación del YAC mediante PFGE

La correcta recombinación homóloga en el YAC APPneo debe suponer una disminución en su tamaño, que se puede visualizar comprobando su mayor movilidad electroforética en una PFGE. Siguiendo esta técnica, se separaron electroforéticamente los 5 clones. Se transfirió el gel a una membrana de nylon y se realizó un *Southern blot* con la sonda del ADNc del gen *APP*, de manera que se hiciera más fácil la visualización del YAC. En la **Figura R.16A** puede verse el gel, tras la migración, teñido con BrEt, y posterior hibridación. Se observó que los clones W4c11, 19, 26, 38 y 49 habían sufrido la variación esperada de 55 kb (tamaño total de 565 kb) en el tamaño del YAC, tras una correcta recombinación.

Finalmente se seleccionó el clon W4c19, del cual se realizó una nueva PFGE y posterior transferencia e hibridación con la sonda del ADNc del gen *APP* y con la sonda que detecta el gen *GABPA* (**Figura R.16B**). Se realizó junto a la cepa de levadura YLBW4, clon original B142F9 y clon B142F9W4-6 (portadores del YAC APP-8), clon APPneoW4-1 portador del YAC APPneo, y un marcador de peso molecular de *S.cerevisiae*.

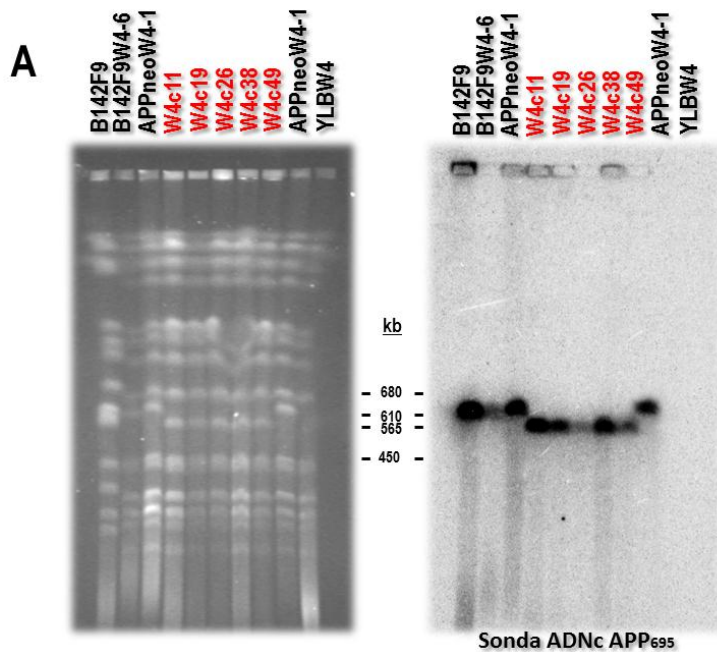
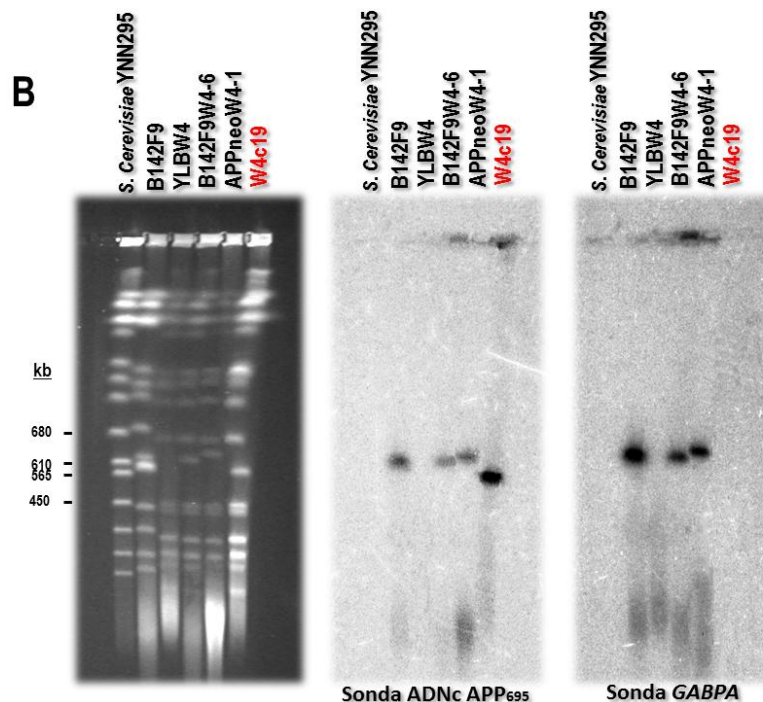


Figura R.16. Separación de cromosomas de levaduras mediante PFGE y posterior *Southern blot*. (A) Análisis de los 5 clones. A la izquierda PFGE teñido con BrEt. A la derecha membrana hibridada con ADNc del gen *APP*. Los 5 clones: W4c11, 19, 26, 38 y 49 (en rojo) presentan el YAC APPwt con su tamaño esperado de 565 kb.

(B) Análisis del clon seleccionado W4c19 (en rojo) con sonda ADNc del gen *APP* y *GABPA*. A la izquierda PFGE teñido con BrEt. En el medio membrana hibridada con ADNc del gen *APP*. A la derecha membrana hibridada con *GABPA*. Se puede observar en esta última membrana que la sonda *GABPA* no hibrida en el clon W4c19, y por tanto se ha eliminado dicho gen en este YAC.

En ambos PFGE se han analizado los nuevos clones junto a los clones utilizados y generados a lo largo del estudio. *S.cerevisiae* YNN295 – marcador estándar de peso molecular



4.2.3.5.2 Análisis de la región codificante por *Southern blot*

Finalmente se realizó un nuevo *Southern blot* comparativo de los 5 clones positivos. Se digirió el ADN genómico de B142F9 y los clones W4c11, 19, 26, 38 y 49 con la enzima de restricción *Bam*H I. Tras la electroforesis y transferencia a membrana, se hibridó usando la sonda del ADNc de la isoforma 695 del gen *APP* siguiendo un proceso equivalente al descrito en los apartados 4.2.1.2. y 4.2.2.2. En su posterior revelado se observó que el patrón teórico coincidía con la escalera de bandas obtenida para el clon original B142F9 y los 5 clones (**Figura R.17**). La conservación de este patrón de bandas

entre estos clones indica que la región codificante no ha sufrido grandes modificaciones ni reordenamientos durante esta segunda recombinación homóloga.

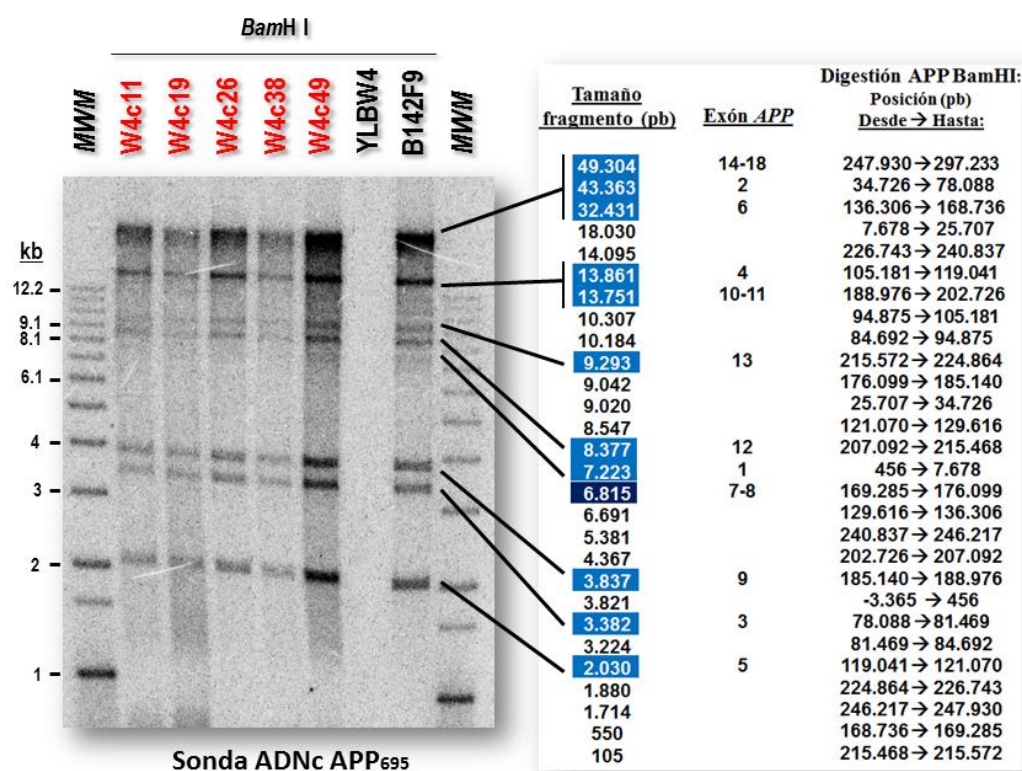


Figura R.17. Análisis por *Southern blot* comparativo del clon B142F9 y clones W4c11, 19, 26, 38 y 49. Se digirió con la enzima de restricción *BamH I* el ADN genómico del clon B142F9 (control positivo), de la levadura YLBW4 (control negativo) y de los clones W4c11, 19, 26, 38 y 49 a analizar. Se separaron en un gel de agarosa, se transfirieron a una membrana de nylon y finalmente se hibridaron con la sonda ADNc de la isoforma 695 del gen *APP*. A la derecha se puede observar el patrón de bandas teórico que se obtiene tras digerir el locus del gen *APP* con *BamH I*, en azul aparecen marcados los fragmentos que contienen alguna región codificante del gen y a su derecha el exón que alberga ese fragmento. El fragmento marcado con azul oscuro alberga los exones 7 y 8, pero no hibrida porque la sonda es del ADNc de la isoforma 695, la cual sufre el procesamiento por *splicing* alternativo de estos exones. A la izquierda, el patrón obtenido tras el *Southern blot* y su coincidencia con el patrón de bandas teórico para los clones B142F9 y W4c11, 19, 26, 38 y 49 (en rojo). MWM – marcador de peso molecular marcado radiactivamente; B142F9 – clon original portador del YAC APP-8 en la cepa de levadura AB1380; YLBW4 – cepa window 4 original.

4.2.3.5.3 Análisis de la región de recombinación mediante *Southern blot*

La fragmentación del YAC mediante la recombinación homóloga provoca, como es lógico, una serie de modificaciones en la secuencia del ADN en la región de recombinación. Las variaciones entre la secuencia del nuevo YAC APPwt y la del YAC original APP-8 se pueden analizar mediante *Southern blot*. Para ello, se digiere el ADN de los clones con unas determinadas enzimas de restricción y se hibrida con una sonda de la propia región de recombinación, obteniéndose un patrón de digestión diferente entre los dos YACs. Tras un análisis de restricción teórico de esa región y comparándola con una que contenga la secuencia prevista tras la recombinación, se puede generar un esquema, en el cual el patrón de digestión resultará distinto entre los YACs. En efecto, tal como se

puede apreciar en el esquema de la **Figura R.18**, el patrón de digestión para *Pst* I y *Bgl* II resulta netamente diferente, aunque acorde a lo esperado.

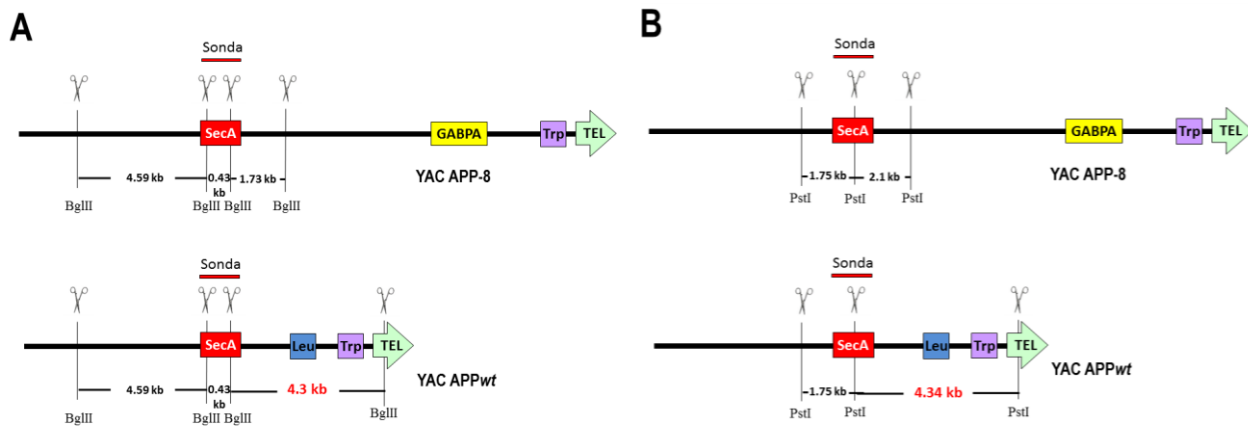


Figura R.18. Esquema teórico del análisis de la región de recombinación mediante **Southern blot**. (A) Patrón teórico de digestión del YAC APP-8 original (Arriba) y del YAC APPwt recombinante (abajo) con la enzima de restricción *Bgl* II. (B) Patrón teórico de digestión del YAC APP-8 original (Arriba) y del YAC APPwt recombinante (abajo) con la enzima de restricción *Pst* I. En ambos esquemas se puede observar que al usar la sonda de la secuencia de recombinación (Sonda SecA) se revela una banda de diferente tamaño (en rojo) en el YAC APPwt, respecto al YAC original, si se ha producido correctamente la recombinación.

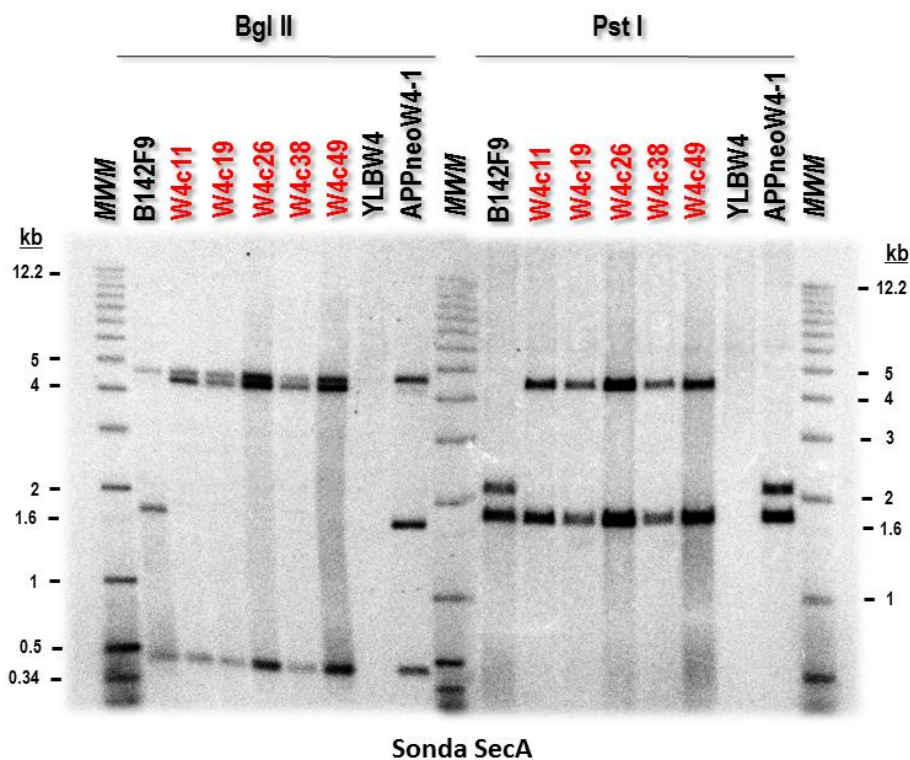


Figura R.19. **Southern blot** de la región de recombinación. Diferencias en el patrón de las bandas del **Southern blot** entre los clones que han sufrido la recombinación homóloga (en rojo) y el clon B142F9 (YAC APP-8), el clon APPneoW4-1 (YAC APPneo) e YLBW4 (no contiene ningún YAC), tras la digestión con las enzimas de digestión *Pst* I y *Bgl* II y posterior hibridación con sonda SecA. Los 5 clones muestran el patrón de bandas esperado (**Figura R.18**) tras una correcta recombinación homóloga. MWM – marcador de peso molecular marcado radiactivamente.

En la **Figura R.19** se puede observar el *Southern blot* realizado para los 5 clones (W4c11, 19, 26, 38 y 49), en comparación con el clon B142F9 (contiene el YAC original APP-8), con el clon APPneoW4-1 (contiene el YAC obtenido tras la primera recombinación: APPneo) y la cepa de levadura YLBW4, que no contiene ningún YAC. Las digestiones con las enzimas de restricción *Pst* I y *Bgl* II y posterior hibridación con la sonda de la secuencia de recombinación, SecA, dan el patrón de bandas esperado para los diferentes clones. La variación en el tamaño de las bandas entre los clones analizados de la segunda recombinación y el resto de clones demuestra que la recombinación ha tenido lugar en el sitio exacto de homología en los 5 clones. Tanto el análisis por PCR, PFGE y *Southern blot* demuestran una recombinación exitosa en la región 3', y por lo tanto, la completa eliminación del gen *GABPA* en estos 5 clones.

4.2.4 TERCERA Y CUARTA RECOMBINACIÓN (POP-IN/POP-OUT): INTRODUCCIÓN DE LA MUTACIÓN “SUECA”

La generación del YAC portador del gen *APP* con la mutación “Sueca”, situada en el exón 16 de dicho gen, se llevó a cabo mediante un nuevo paso de recombinación homóloga en levaduras, conocido como método de *Pop-in/Pop-out* (Giraldo et al., 1999; Giraldo, 2002). Dicho proceso consiste, en realidad, en dos rondas consecutivas de recombinación homóloga que tienen como resultado la incorporación de la mutación deseada de una forma limpia y precisa, sin dejar rastro del gen de selección utilizado.

4.2.4.1 Estudio de las regiones repetitivas y elección de la secuencia de homología

La mutación “Sueca” consiste en dos mutaciones puntuales en el exón 16 del gen *APP*. En el codón 670 (AAG), que codifica para Lisina (K), se produce una transversión y la G pasa a ser T, por lo que el nuevo codón AAT codifica para Asparagina (N). En el siguiente codón, el codón 671, también se produce una transversión de nuevo de una purina a pirimidina, y el codón ATG que codifica para Metionina (M) pasa a ser, tras la mutación, un codón CTG, que codifica para Leucina (L). El nombre de la mutación sueca se resume de la siguiente forma: K670N/M671L (Mullan et al., 1992).

Para localizar las secuencias repetitivas en el entorno del exón 16 del gen *APP* se utilizó el programa bioinformático *RepeatMasker*, lo que permitió la selección de una secuencia de 1400 pb a la que se denominó secuencia gAPP16, por ser la secuencia genómica que comprende el exón 16 del gen *APP* y parte de sus intrones colindantes. Esta secuencia deja unas 700 pb a cada lado de la

mutación. La posterior realización de una matriz de homología de esta secuencia frente a toda la estructura del YAC APP-8 con el programa *MacVector*, permitió la identificación de una región de similitud de secuencia entre las 900 y 1200 pb. (**Figura R.20**).

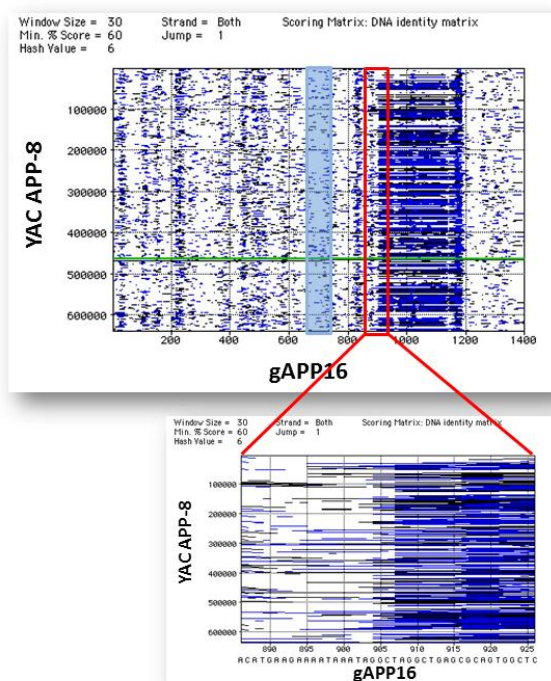


Figura R.20. Matriz de homología de secuencia de gAPP16 y el YAC APP-8 (*MacVector*). Eje Y: aproximadamente las 610 kb del YAC APP-8. Eje X: las 1400 pb de la secuencia gAPP16. En la matriz se representa en azul oscuro la similitud de secuencias entre las dos secuencias a analizar, por lo que se puede apreciar un alto grado de similitud entre las 900 y 1200 pb. La zona sombreada en azul claro marca el lugar donde se encuentra el exón 16 del gen *APP* en la secuencia gAPP16. La línea verde indica la situación exacta de gAPP16 en el YAC. La ampliación de la zona marcada en rojo muestra que la región de alto grado de similitud de secuencias empieza aproximadamente a partir del nucleótido 905.

Tras dicho análisis, se decidió acotar la secuencia hasta la posición 900, justo al inicio de la zona que presentaba similitud de secuencia respecto al YAC, dejando finalmente las 700 pb de la zona anterior a la mutación, y 200 pb de la zona posterior. Una vez seleccionada esta secuencia única de 900 pb para el proceso de recombinación, se diseñaron unos cebadores para su clonaje (apartado 3.2.3); uno situado en el intrón 16 del gen *APP*, y otro en el intrón 17, amplificando finalmente, mediante PCR a partir de ADN del clon B142F9, un fragmento de ADN de 902 pb al que se seguirá denominando gAPP16. Estos cebadores contienen en su zona 5' unos nucleótidos extra, que son dianas de corte para la enzima de restricción *Bam*H I en un cebador y *Hind* III en el otro, con el fin de facilitar su introducción en el plásmido de recombinación.

4.2.4.2 Generación del vector de recombinación pRS306-APP16swe

Lo primero que se necesita para el proceso de *Pop-in/Pop-out* es un plásmido que contenga la región de homología con el YAC a modificar y dentro de la cual se encuentre la mutación que se desea incorporar. Esta zona de homología debe contener una diana de restricción única para poder hacer lineal el vector antes de la transformación y promover así la recombinación homóloga a partir

del punto de corte. Además, el plásmido necesita el marcador de selección *ura3*, uno de los pocos que permite en levaduras la doble selección [a favor eliminando en el medio uracilo (–U) y en contra añadiendo 5-FOA] en las dos rondas consecutivas de recombinación.

Para la generación del vector de recombinación se partió del plásmido pRS306 (4.4 kb) (Sikorski & Hieter, 1989) que contenía el marcador de selección *ura3* (**Figura R.21**). Dicho plásmido se digirió con las enzimas de restricción *Hind* III y *Bam*H I y se procedió a la purificación del fragmento de 4343 pb. A continuación se procedió a la purificación del producto de PCR de gAPP16 de 902 pb, y se digirió igualmente con *Hind* III y *Bam*H I con el fin de facilitar su introducción y orientación adecuada en el vector de recombinación. Mediante el uso de la enzima T4 ADN ligasa se ligó gAPP16 con extremos cohesivos de *Hind* III y *Bam*H I con las 4343 pb del pRS306 con corte *Hind* III y *Bam*H I, generándose el vector pRS306-gAPP16 (5.2 kb) (**Figura R.21**).

El siguiente paso consistió en la realización de la mutagénesis dirigida usando el kit comercial *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen). Para ello se diseñaron los cebadores (apartado 3.2.3), uno de ellos con la mutación ya incorporada y el otro solapante. Lo primero que se realizó fue la metilación del plásmido pRS306-gAPP16, y a continuación la PCR. Al final del proceso se encontraba en la misma reacción plásmidos generados a partir de la PCR que portaban la mutación y que no se encontraban metilados; y plásmidos sin la mutación, que habían servido de molde para la PCR, que se encontraban metilados. En el siguiente paso de transformación en bacterias *mcrBC* de la cepa *E.coli*, el plásmido metilado sufre la digestión por endonucleasas propias de la bacteria, transformándose así únicamente con el plásmido portador de la mutación: pRS306-gAPP16swe. Se comprobó posteriormente, mediante digestión enzimática y secuenciación del vector, la introducción precisa de la mutación en el vector. De 16 clones de bacterias analizados, todos habían incorporado el vector con la mutación.

Una vez obtenido el plásmido pRS306-gAPP16swe, se hizo lineal mediante el uso de la enzima *Sna*B I para su correcto uso en el paso de recombinación y generación de clones *Pop-in* a partir del YAC APPwt. El esquema de la generación y linealización del plásmido de recombinación pRS306-gAPP16swe se muestra en la **Figura R.21**.

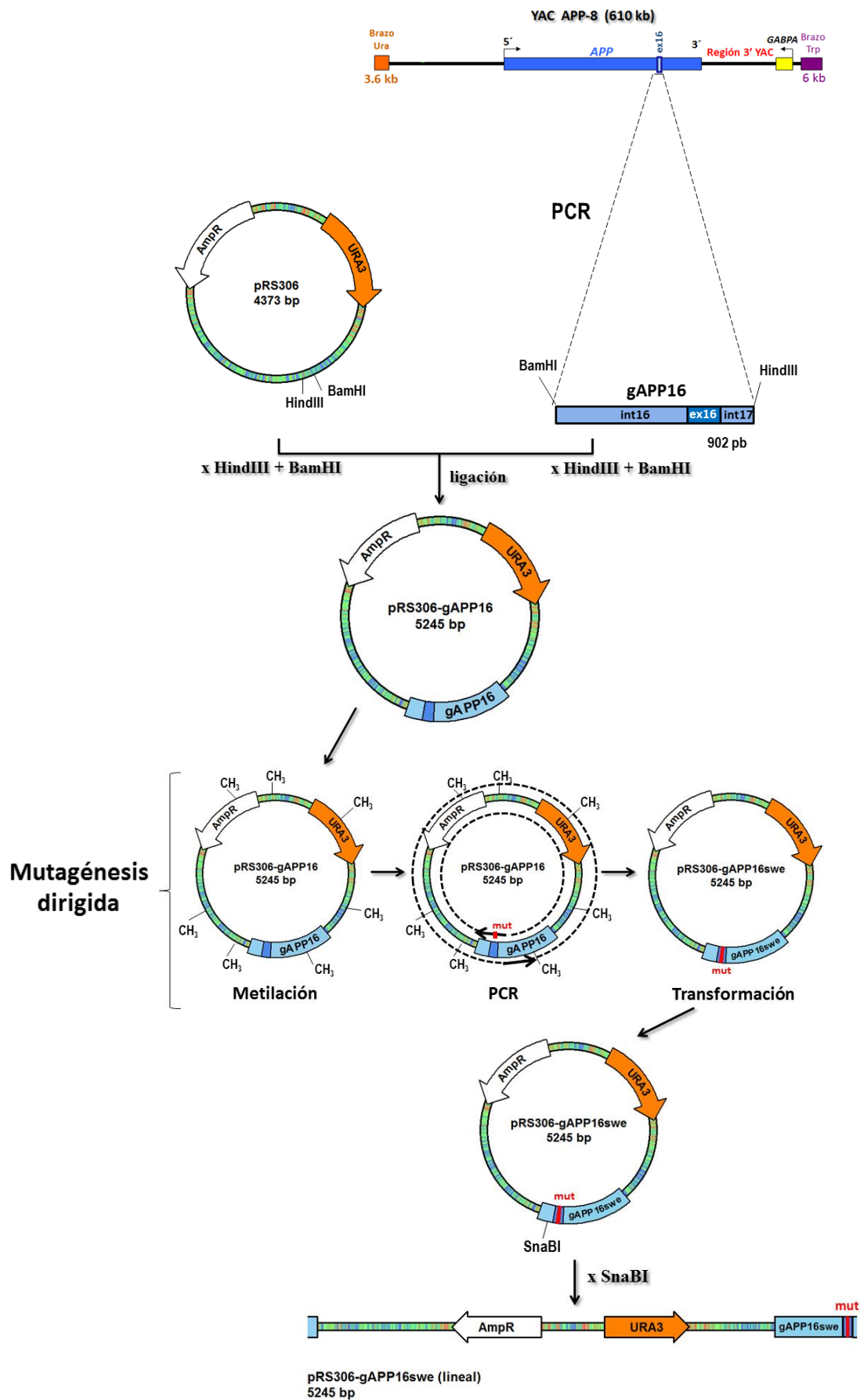


Figura R.21. Esquema de la generación del plásmido de recombinación pRS306-gAPP16swe y su posterior linealización. La línea roja y las letras “mut” en rojo representan la mutación “Sueca” en el exón 16 del gen *APP* humano.

4.2.4.3 Recombinación homóloga en el YAC APPwt (Generación de *Pop-in*)

La recombinación homóloga en el entorno del exón 16 para la introducción de la mutación se realizó sobre el YAC resultante de la segunda recombinación, el YAC APPwt (apartado 4.2.3.3). Para ello se seleccionó el clon W4c19 y a partir de él se prepararon levaduras competentes para utilizar en la transformación. Se utilizó el vector de recombinación pRS306-gAPP16swe. Este plásmido se corta con la enzima *Sna*B I haciéndose lineal (5.2 kb). Se procede a la purificación en gel de agarosa para posteriormente usar en la transformación. El proceso de *Pop-in/Pop-out* aparece esquematizado en la **Figura R.22**. Durante la ronda de recombinación homóloga para la generación de los clones *Pop-in*, se produjo la integración del vector de 5.2 kb, portador de la mutación sueca, en el entorno del exón 16 del gen *APP* (**Figura R.22A**).

Para la realización de esta recombinación se ha utilizado de nuevo el método del AcLi. Mediante la transformación del clon competente W4c19 con 600 ng del vector pRS306-gAPP16swe lineal, se obtuvieron más de 300 colonias, capaces de crecer en el medio selectivo para el nuevo YAC (SD –K –W –L –U, medio sin lisina, triptófano, leucina y uracilo) al haber incorporado el gen *ura3*. Se seleccionaron un total de 24 colonias, denominadas W4c19PI 1-24.

4.2.4.3.1 Análisis de los clones *Pop-in* mediante PCR, PFGE y *Southern blot*

Como primer análisis de los 24 clones *Pop-in* seleccionados, se realizó una PCR para el exón 16 del gen *APP*, siendo los 24 clones positivos, confirmando así la presencia del YAC. Para continuar, se realizó una serie de tres PCRs: la primera con unos cebadores que delimitan la región de recombinación, y amplifican una secuencia de 1358 pb en el YAC sin modificar (PCR1), de tal forma que si se había dado la recombinación en el lugar esperado, no se obtendría dicho producto de PCR, sino otro de mucho mayor tamaño frecuentemente imposible de obtener. La segunda consistía en una PCR híbrida usando un cebador de la PCR1, situado en el YAC antes de la región de recombinación, y el otro cebador en el plásmido de recombinación pRS306-gAPP16swe, que amplifica una secuencia de 1066 pb (PCR2). La tercera PCR consistía en una nueva PCR híbrida, pero esta vez en el otro extremo; un cebador en el plásmido de recombinación pRS306-gAPP16swe y el otro cebador el usado en la PCR1 situado en el YAC después de la región de recombinación, que amplifican una secuencia de 1799 pb (PCR3). El esquema de estas tres PCRs analíticas se muestra en la **Figura R.23A**. De las 24 colonias analizadas, 5 fueron negativas para la PCR1 y positivas para las PCRs híbridas (PCR2 y PCR3): W4c19PI-10, 13, 14, 17 y 20. (**Figura R.23B**).

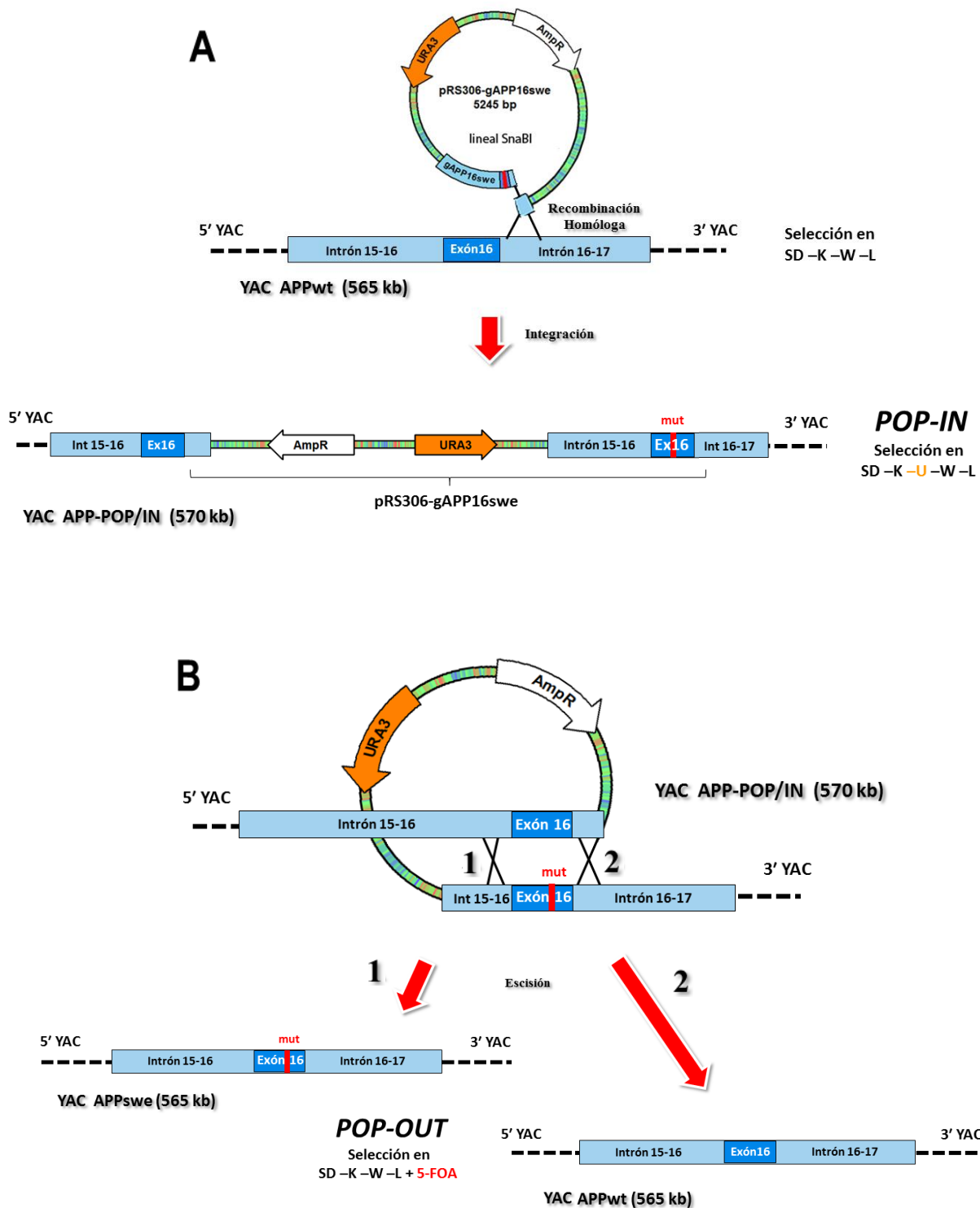


Figura R.22. Esquema del proceso de Pop-in/Pop-out. (A) Tras el primer paso de recombinación (*POP-IN*) sobre el YAC APPwt, se produce la integración del plásmido pRS306-gAPP16swe, que porta, además del marcador *ura3* para la selección del nuevo YAC, la mutación en su secuencia de homología, obteniéndose finalmente el YAC APP-POP/IN con la duplicación de la zona de homología: una con la original y la otra con la mutación. (B) Tras la selección y análisis del clon *Pop-in*, se hace crecer éste con uracilo en el medio, haciendo que el marcador *ura3* no se requiera para la viabilidad de la levadura y promoviendo así el segundo paso de recombinación (*POP-OUT*); dando como resultado los clones *Pop-out*, que portarán el YAC APPwt de partida (2) o el YAC APPswe (1) que ha incorporado la mutación.

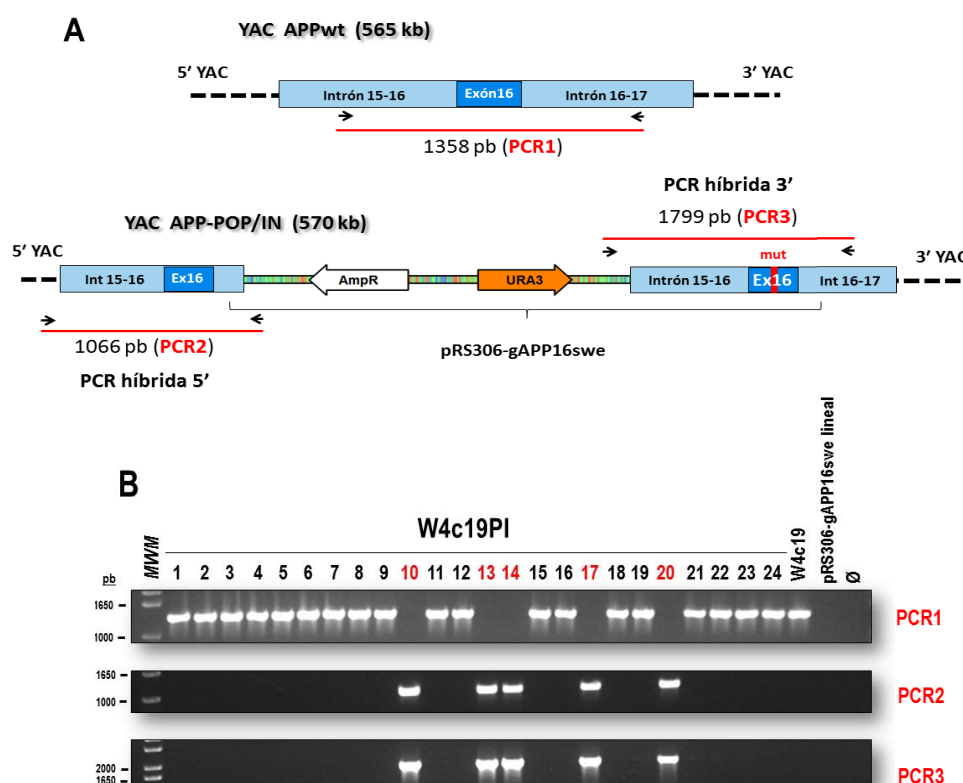


Figura R.23. Análisis por PCR de colonias seleccionadas de la tercera recombinación homóloga (*POP-IN*). (A) Arriba: Diseño de la PCR (PCR1) sobre la región de recombinación para el YAC APPwt de partida. En el caso de haberse incorporado el plásmido de recombinación en el lugar esperado, esta PCR debería ser negativa debido al tamaño demasiado grande del producto de PCR. Abajo: Diseño de las dos PCRs híbridas en el extremo 5' y 3' (PCR2 y PCR3, respectivamente) respecto al YAC, en los clones *Pop-in*, tras una correcta recombinación. (B) PCR de las 24 colonias seleccionadas. En rojo se marcan las 5 colonias que se han comportado según lo esperado tras una correcta recombinación. *MWM* – marcador de peso molecular; W4c19 – clon portador del YAC APPwt. pRS306-gAPP16swe – plásmido usado en la recombinación. Ø – control sin ADN.

Al igual que el análisis sistemático llevado a cabo tras los anteriores pasos de recombinación homóloga, el análisis de estos 5 clones se completó mediante el uso de otras PCRs que podían aportar más información sobre la estructura de los mismos: regiones propias de los brazos del YAC (gen *neo*), análisis de la región 5' del YAC (Sec1 y Sec2), de algunos exones internos del gen *APP* (exón 6 y exón 12-13) y regiones situadas en la región 3' del YAC (SecA'). Los 5 clones seleccionados W4c19PI-10, 13, 14, 17 y 20 fueron positivos también para todas estas PCRs.

Una vez seleccionados los 5 clones mediante la técnica de PCR, se realizó una PFGE para la visualización del incremento de tamaño del YAC APP-POP/IN, que se debería poder visualizar comprobando su menor movilidad electroforética. Siguiendo esta técnica de forma equivalente a la descrita en el apartado 4.2.1.2., se separaron electroforéticamente los 5 clones. Se transfirió el gel a una membrana de nylon y se realizó un *Southern blot* con la sonda del ADNc del gen *APP*, haciendo más fácil la visualización del YAC (**Figura R.24**). Se pudo observar que los clones W4c19PI-14 y 20

habían sufrido el incremento de aproximadamente 5 kb de tamaño esperado en su YAC (tamaño total de 570 kb) respecto al YAC APP^{w^t} de partida presente en el clon W4c19, lo que correspondía posiblemente a la incorporación de una única copia del plásmido (5.2 kb) tras una correcta recombinación. En cuanto al análisis de los clones W4c19PI-10, 13 y 17, se observó un aumento de tamaño más acusado en el YAC debido probablemente a la incorporación de múltiples copias en tándem del vector de recombinación (múltiplos de 5.2 kb).

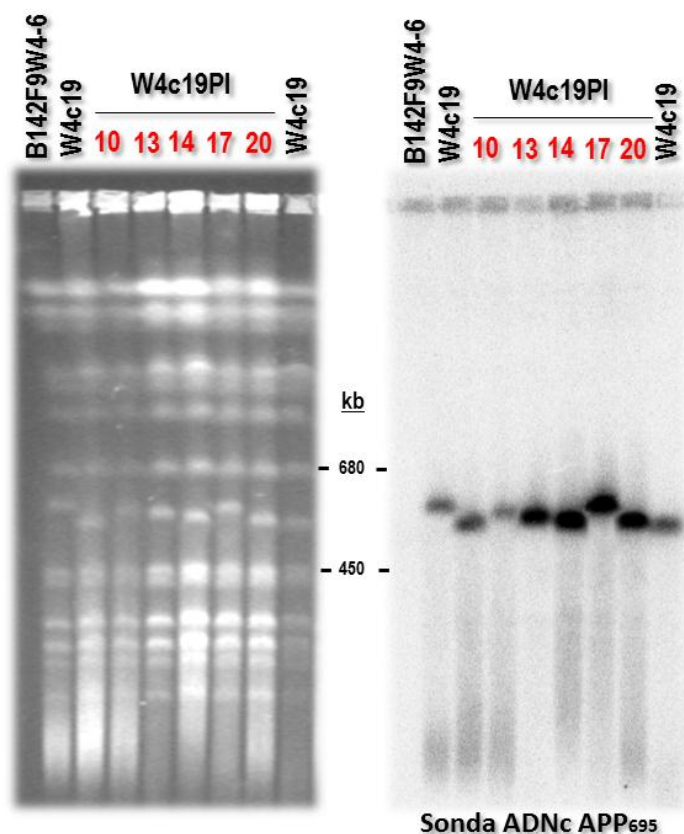


Figura R.24. Separación de cromosomas de levaduras mediante PFGE y posterior *Southern blot*. Análisis de los 5 clones positivos W4c19PI (en rojo). A la izquierda PFGE teñido con BrEt. A la derecha membrana hibridada con ADNc del gen *APP*. Los clones W4c19PI-14 y 20 parecen presentar el incremento esperado de tamaño del nuevo YAC APP-POP/IN respecto al YAC APP^{w^t} del clon W4c19 de partida, sugiriendo la incorporación de una única copia del plásmido de recombinación (5.2 kb). Los clones W4c19PI-10, 13 y 17 muestran todavía mayor incremento de tamaño, provocado posiblemente por la incorporación de múltiples copias en tándem del plásmido de recombinación (múltiplos de 5.2 kb).

B142F9W4-6 – Clon portador del YAC APP-8 original de 610 kb; W4c19 – Clon portador del YAC APP^{w^t} de 565 kb.

La integración del plásmido de recombinación en el YAC mediante esta recombinación homóloga provoca una serie de modificaciones en la secuencia del ADN en la región de recombinación (entorno del exón 16 del gen *APP*). Estas variaciones entre la secuencia del nuevo YAC APP-POP/IN en comparación a la del YAC APP^{w^t} de partida se analizaron mediante *Southern blot*. Se digirió el ADN de los clones con unas determinadas enzimas de restricción y se hibridó con una sonda propia de la región de recombinación, obteniéndose un patrón de digestión diferente entre los dos YACs. Tras un análisis de restricción teórico de la región de recombinación en el YAC APP^{w^t} y comparándola con la que contendría el YAC APP-POP/IN tras la recombinación, se generó un esquema, en el cual el patrón de digestión resultó distinto entre ambos YACs mediante el uso de las enzimas de restricción *Hind* III, *Sac* I y *Bbv*C I. (**Figura R.25**).

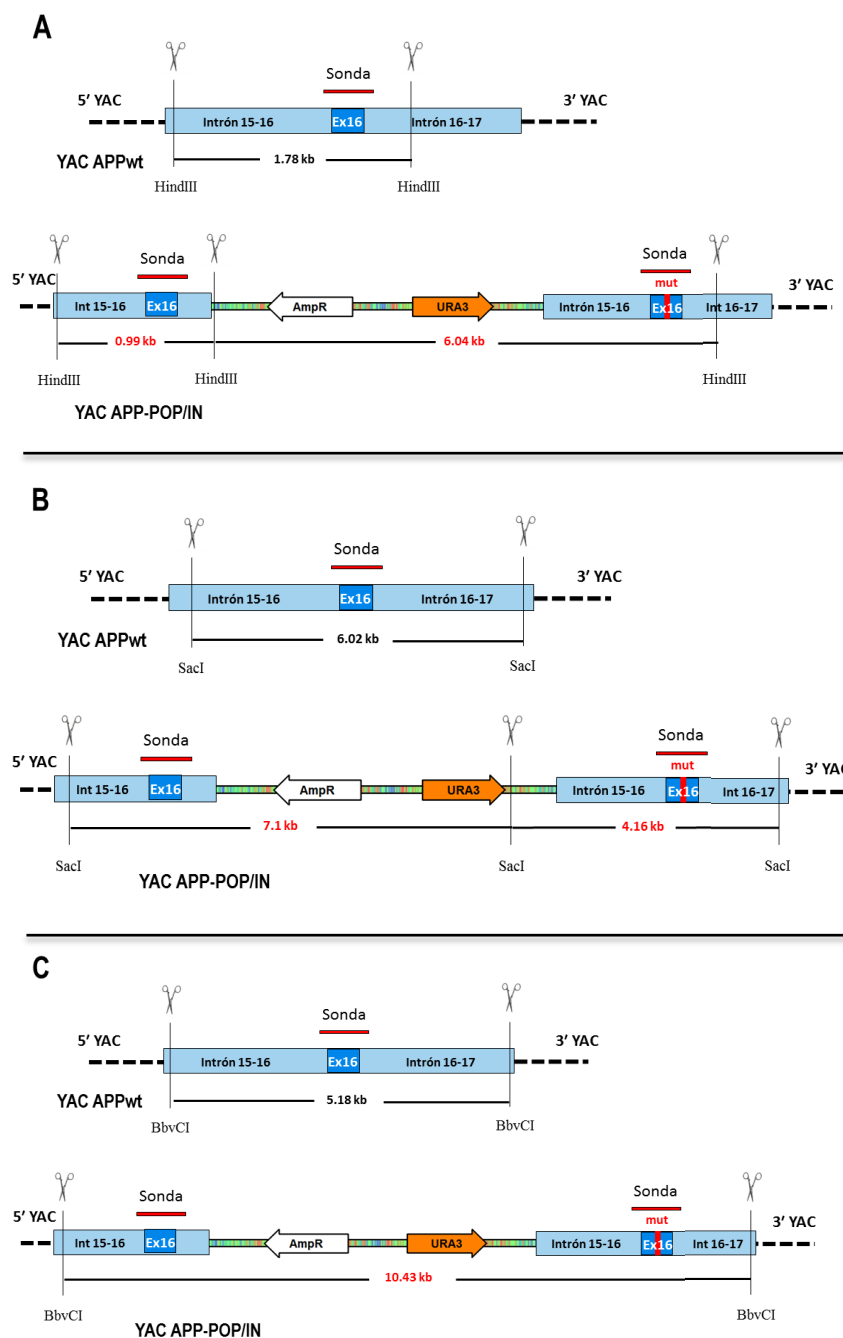


Figura R.25. Esquema teórico del análisis de la región de recombinación mediante *Southern blot*. Patrón teórico de digestión del YAC APPwt y del YAC APP-POP/IN recombinante con la enzima de restricción *Hind* III (A), *Sac* I (B) y *Bbv* C I (C). En los esquemas se puede observar que al usar una sonda propia de la secuencia de recombinación (Sonda exón16APP) se revelan bandas de diferente tamaño (en rojo) en el YAC APP-POP/IN respecto al YAC APPwt de partida, si se ha producido correctamente la recombinación.

En la **Figura R.26** se puede observar el *Southern blot* realizado para los 5 clones (W4c19PI-10, 13, 14, 17 y 20), en comparación con el clon W4c19 (contiene el YAC APPwt) y la cepa de levadura YLBW4, que no contiene ningún YAC. Las digestiones se realizaron con las enzimas de restricción *Hind* III, *Sac* I y *Bbv* C I, y posteriormente se hibridó con la sonda obtenida de la PCR del exón 16 del gen *APP*. Para los clones W4c19PI-14 y 20 se obtuvo el patrón de bandas esperado tras una correcta recombinación. Para los clones W4c19PI-10, 13 y 17 además de observarse las bandas esperadas tras el corte con *Hind* III y *Sac* I, se observó una banda adicional de 5.2 kb, correspondiente al plásmido de recombinación, ya que al contener una diana de restricción para cada

una de las enzimas dentro de dicho plásmido, la incorporación de múltiples copias en tándem del vector de recombinación permite observar un patrón de corte del tamaño del propio vector. Adicionalmente, al observar el corte con la enzima *BbvC* I, que no corta en la secuencia del vector, se ve directamente un incremento de tamaño mayor al de la banda esperada, pudiéndose concluir que el clon W4c19PI-17 es el que más copias en tándem ha integrado, seguido del clon W4c19PI-10 y finalmente el clon W4c19PI-13, resultados que se corresponden con los obtenidos en la menor movilidad electroforética observada en el PFGE para cada clon. (Figura R.24).

En resumen, la variación en el tamaño de las bandas entre los 5 clones seleccionados de la tercera recombinación y el clon W4c19 demuestra que la recombinación ha tenido lugar en el sitio exacto de homología en los 5 clones, produciéndose la incorporación de una única copia del vector en los clones W4c19PI-14 y 20, y múltiples copias en tándem del vector en los clones W4c19PI-10, 13 y 17. Finalmente se seleccionó el clon W4c19PI-20 para el siguiente paso de recombinación en la generación de clones *Pop-out*.

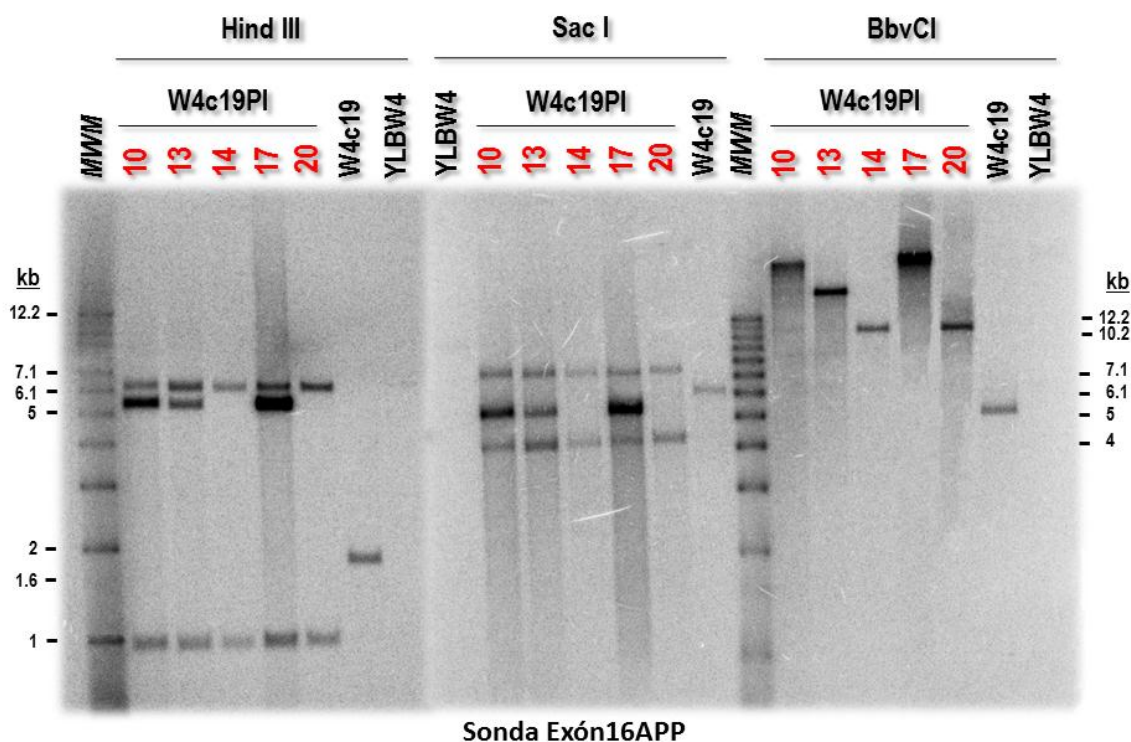


Figura R.26. Southern blot de la región de recombinación. Diferencias en el patrón de las bandas del Southern blot entre los clones que han sufrido la recombinación homóloga (en rojo) y el clon W4c19 (YAC APP^{wt}) tras la digestión con las enzimas de digestión *Hind* III, *Sac* I y *BbvC* I, y posterior hibridación con la sonda exón16APP. Los clones 14 y 20 muestran el patrón de bandas esperado (Figura R.25) tras una correcta recombinación homóloga e integración de una única copia del vector. Los clones 10, 13 y 17 han incorporado varias copias en tándem del vector de recombinación. MWM – marcador de peso molecular marcado radiactivamente. YLBW4 – cepa de levadura carente de YAC.

4.2.4.4 Recombinación homóloga en el YAC APP-POP/IN (Generación de *Pop-out*)

Para la obtención del YAC APP^{swe}, denominado así por contener únicamente el gen *APP* con la mutación “Sueca” (*swe*, del inglés *swedish*), que finalmente portará dicha mutación en el exón 16 del gen *APP*, se utilizó el YAC APP-POP/IN resultante del paso de recombinación previo. Para ello, como ya se ha mencionado, se seleccionó el clon W4c19PI-20.

Tras el paso de obtención del clon W4c19PI-20, como ya se ha observado, la zona de homología queda duplicada, de tal forma que permanece la secuencia original, que estaba presente en el YAC APP^wt de partida, y aparece la secuencia mutante que portaba el plásmido. Para el paso de obtención de los clones *Pop-out* se puso a crecer el clon W4c19PI-20 durante 16 horas en medio líquido SD –K –W –L. El uracilo se añade al medio y así el gen *ura3* no se requiere para la viabilidad de la levadura, promoviendo la recombinación y pérdida de este marcador auxotrófico. El paso de recombinación homóloga se puede dar a dos niveles y con la misma probabilidad: en una se obtiene de nuevo el YAC APP^wt de partida, con la secuencia de exón 16 del gen *APP* en su variante silvestre; y en la otra se obtiene el YAC APP^{swe} de interés, con la secuencia del exón 16 del gen *APP* portadora de la mutación “Sueca”. (**Figura R.22B**). Una vez las levaduras han crecido durante las 16 horas en el medio líquido, se plaquean en medio SD –K –W –L + 5-FOA. Este 5-FOA (marcador de selección negativo) se metaboliza por acción de la descarboxilasa codificada por el gen *ura3*, lo que conduce al acúmulo de metabolitos tóxicos, y por lo tanto se inhibe el crecimiento de las levaduras que conservan este marcador *ura3* (Adams et al., 1997; Giraldo, 2002). Finalmente, en la placa se obtuvieron un total de 3 colonias capaces de crecer en dicho medio selectivo, denominadas W4c19PO-1, 2 y 3.

4.2.4.4.1 Análisis de los clones *Pop-out* mediante PCR, PFGE y *Southern blot*

Lo primero que se realizó fue la serie de 3 PCRs utilizadas para selección de los clones *Pop-in* (**Figura R.23A**), de tal forma que en el caso de haberse producido la recombinación de forma correcta, la PCR1 debería ser positiva (al contrario que el clon *Pop-in*), amplificando una banda de 1358 pb y haber vuelto al tamaño de la secuencia de partida que presentaba el YAC APP^wt. Por el contrario las dos PCRs híbridas (PCR2 y PCR3) deberían ser negativas en los clones *Pop-out* al haber perdido de nuevo la secuencia correspondiente al plásmido de recombinación. Las 3 colonias se comportaron según lo esperado tras una correcta recombinación, obteniéndose el producto amplificado de la PCR1 y siendo negativas para las PCRs híbridas (PCR2 y PCR3) (**Figura R.27**).

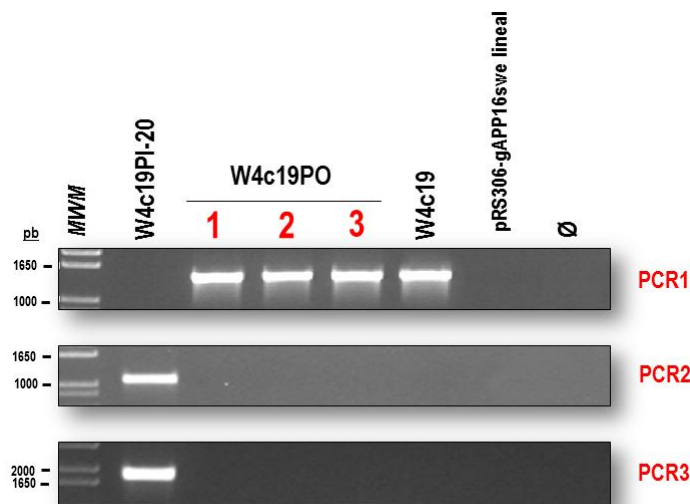


Figura R.27. Análisis por PCR de colonias obtenidas en la cuarta recombinación homóloga (*POP-OUT*). Serie de PCRs de las 3 colonias obtenidas. Se puede observar que las 3 colonias *Pop-out* (en rojo) obtenidas a partir del *Pop-in* W4c19PI-20 han sufrido una correcta recombinación, eliminando el plásmido de recombinación y recuperando el tamaño de la secuencia de partida que portaba el clon W4c19. Para ver el diseño de estas 3 PCRs ver **Figura R.23A**. MWM – marcador de peso molecular; W4c19 - clon portador del YAC APPwt. pRS306-gAPP16sve – plásmido usado en la recombinación. Ø – control sin ADN.

El principal punto de interés en estos 3 clones *Pop-out* obtenidos reside en saber si la secuencia del exón 16 del gen *APP* ha incorporado la mutación “Sueca”. Para ello, lo primero que se realizó fue un estudio de análisis de restricción, utilizando el programa *pDRAW32*, en el entorno del exón 16, observando que la enzima de restricción *Mbo* II tiene un corte en la secuencia original del exón 16 del gen *APP* a nivel de los nucleótidos a modificar, de tal forma que, si se produce la incorporación de la mutación, se pierde dicha diana de restricción para esta enzima. Así, se decidió realizar una PCR del exón 16 (507 pb) para todos los clones, siendo los 3 clones positivos (**Figura R.29A**). A continuación se purificó el producto de PCR del exón 16 de cada clon y se digirió con la enzima de restricción *Mbo* II. El patrón de corte que se debería obtener para el producto del exón 16 del YAC APPwt sería: 198, 177, 118 y 14 pb; para el producto del exón 16 del YAC APPswe sería: 375 (debido a que se pierde el corte), 118 y 14 pb. El esquema de la digestión del producto del exón 16 del gen *APP* para ambos YACs se muestra en la **Figura R.28**.

Finalmente, tras la digestión con *Mbo* II, se cargaron los productos de esta digestión en un gel de agarosa horizontal *NuSieve® GTG®* de alta resolución al 3%. Tras la electroforesis se observó que los clones W4c19PO-1 y 3 eran portadores de la mutación y mostraban el patrón de corte esperado, con dicha mutación, al digerir con *Mbo* II; mientras que el clon W4c19PO-2 contenía la secuencia silvestre. En el clon W4c19PI-20, clon *Pop-in* de partida, se observan ambos patrones al tener duplicada la zona de homología (que incluye la secuencia silvestre y la secuencia con la mutación) (**Figura R.29A**). El estudio se completó con la secuenciación de estos productos de PCR del exón 16 del gen *APP* para los 3 clones, demostrando que los clones W4c19PO-1 y 3 tenían los dos nucleótidos esperados mutados (**Figura R.29B**).

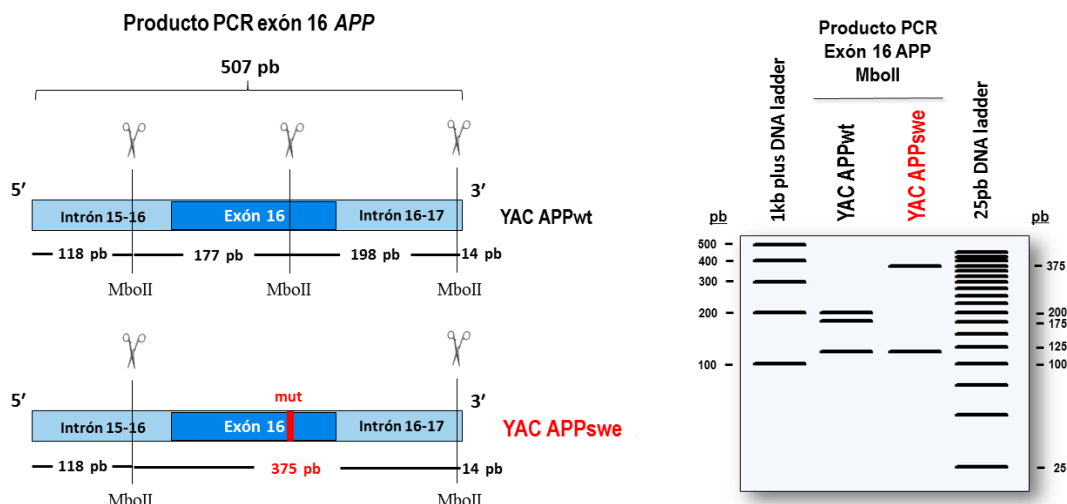


Figura R.28. Esquema teórico del análisis del producto de PCR del exón 16 del gen *APP* mediante restricción enzimática (*pDRAW32*). Patrón teórico de digestión del YAC APPwt y del YAC APPswe con la enzima de restricción *Mbo* II en el producto de PCR del exón 16 del gen *APP* de ambos. En el esquema de la izquierda se puede observar que debido a la introducción de la mutación se pierde una diana de corte para dicha enzima, obteniéndose de ese modo 3 fragmentos de 375 (en rojo), 118 y 14 pb en el YAC APPswe; mientras que el patrón para el YAC APPwt era de 198, 177, 118 y 14 pb. A la derecha se puede observar una electroforesis virtual de un gel de agarosa al 3%, generada gracias al programa *pDRAW32*, de ambos productos de PCR digeridos con *Mbo*II. El carril 1 y 4 muestran dos marcadores de peso molecular diferentes. Debido al tamaño molecular tan pequeño del fragmento de 14 pb, se hace prácticamente imposible su visualización en dicho gel.

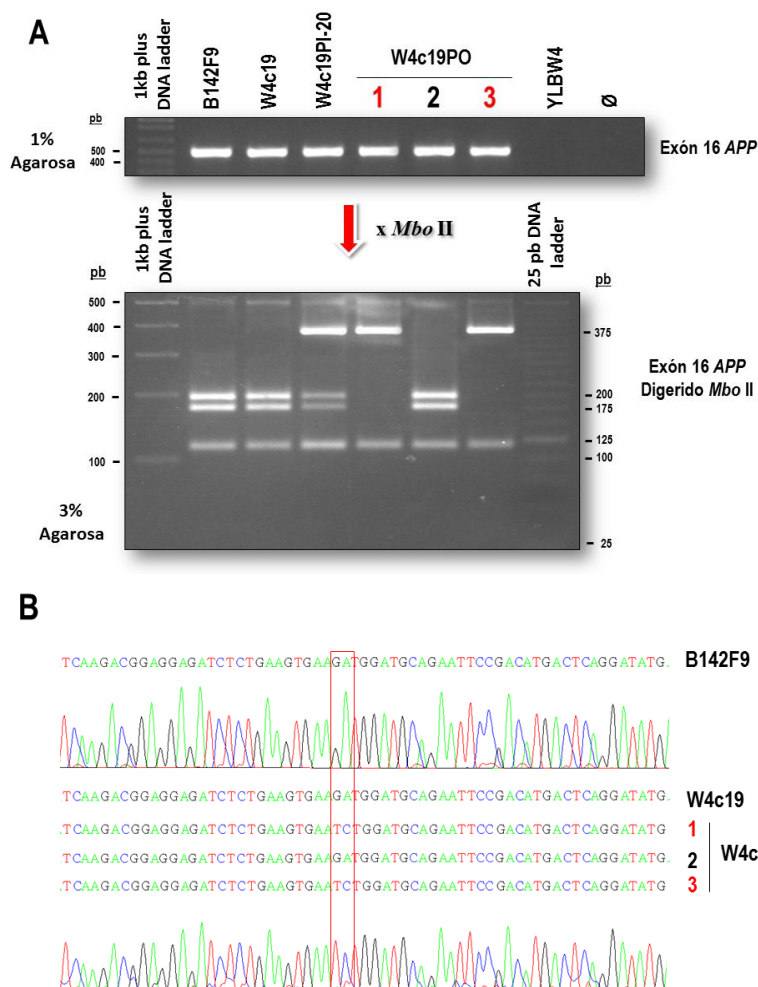


Figura R.29. Análisis del producto de PCR del exón 16 del gen *APP*. (A) Análisis mediante restricción enzimática con *Mbo* II. Se puede apreciar que los 3 clones obtenidos fueron positivos para el exón 16 del gen *APP*. Sin embargo, tras la digestión con la enzima, se observa que los clones que han introducido la mutación son el clon W4c19PO-1 y 3 (en rojo) debido a que han perdido una diana de corte para dicha enzima, obteniéndose el patrón esperado al haberse introducido la mutación, mientras que el patrón del clon W4c19PO-2 se corresponde con la secuencia silvestre (Figura R.28). El clon W4c19PI-20 tiene todas las bandas porque tiene duplicada la zona de homología, la secuencia silvestre y la secuencia con la mutación. (B) Secuenciación del producto de PCR del exón 16 *APP*. El cuadro rojo marca el lugar del cambio de nucleótidos en la mutación. Se demuestra que los clones que han introducido la mutación son el clon W4c19PO-1 y 3 (en rojo) ya que han mutado los nucleótidos esperados: GA → TC, siendo así los clones portadores del YAC con la mutación "Sueca" del gen *APP*. B142F9 – clon original portador del YAC APP-8; W4c19 – clon portador del YAC APPwt. YLBW4 – cepa *window* 4 original sin YAC; Ø – control sin ADN.

Para finalizar el estudio mediante PCR, se procedió de nuevo al análisis sistemático de diferentes regiones del YAC en los 2 clones W4c19PO- 1 y 3. Los 2 clones fueron positivos para todas las PCRs analíticas testadas (**Figura R.30**).

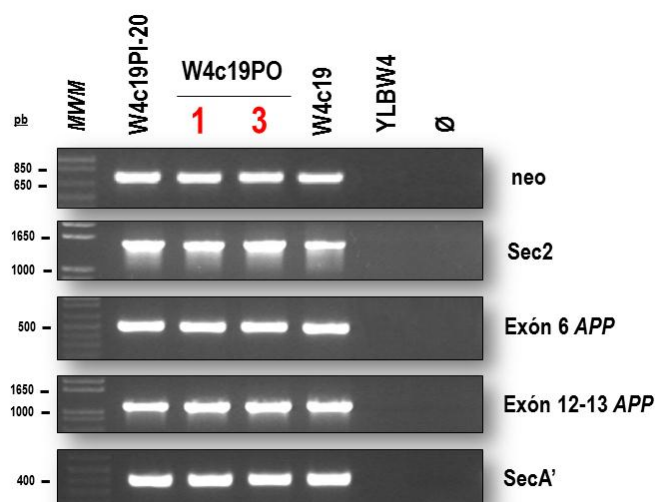


Figura R.30. Análisis por PCR de colonias positivas de la cuarta recombinación homóloga (**POP-OUT**). Análisis de diferentes secuencias a lo largo del YAC de los 2 clones positivos portadores de la mutación "Sueca". Ambos fueron positivos para todas las PCRs a lo largo del YAC.

MWM – marcador de peso molecular; W4c19 - clon portador del YAC APPwt. YLBW4 - cepa window 4 original sin YAC; Ø – control sin ADN.

Una vez seleccionados los 2 clones portadores de la mutación mediante la técnica de PCR, digestión enzimática y secuenciación, se realizó una PFGE para la visualización del YAC APP^{swe}, que debería ser del mismo tamaño que el YAC APPwt de partida tras una correcta recombinación. Se separaron electroforéticamente los 2 clones. Se transfirió el gel a una membrana de nylon y se realizó un *Southern blot* con la sonda del ADNc del gen APP, haciendo más fácil la visualización del YAC (**Figura R.31**). Se pudo observar que ambos clones habían sufrido el descenso de tamaño en su YAC, respecto al del clon W4c19PI-20, al perder el plásmido de recombinación, y que el tamaño era exactamente el mismo al YAC APPwt de partida (565 kb), tal y como era de esperar.

Para la generación de los clones *Pop-out* se promueve la recombinación homóloga y con ello la escisión del plásmido de recombinación en el YAC. Esto supone, en estos clones, una recuperación en el patrón de bandas que presenta el clon de partida W4c19 en la región de recombinación, al compararlo con el clon W4c19PI-20, al digerir el ADN de los clones con las enzimas de restricción *Hind* III, *Sac* I y *BbvC* I (ver patrón en **Figura R.25**).

En la **Figura R.32** se puede observar el *Southern blot* realizado para los 2 clones *Pop-out* portadores de la mutación (W4c19PO-1 y 3), en comparación con el clon W4c19PI-20 (clon *Pop-in*) y el clon W4c19 (contiene el YAC APPwt). Las digestiones se realizaron con las enzimas de restricción *Hind* III, *Sac* I y *BbvC* I, y posteriormente se hibridó con la sonda obtenida de la PCR del exón 16 del

gen *APP*. En las 3 digestiones puede observarse que los 2 clones *Pop-out* han recuperado el tamaño del clon de partida W4c19 como era de esperar tras una correcta recombinación.

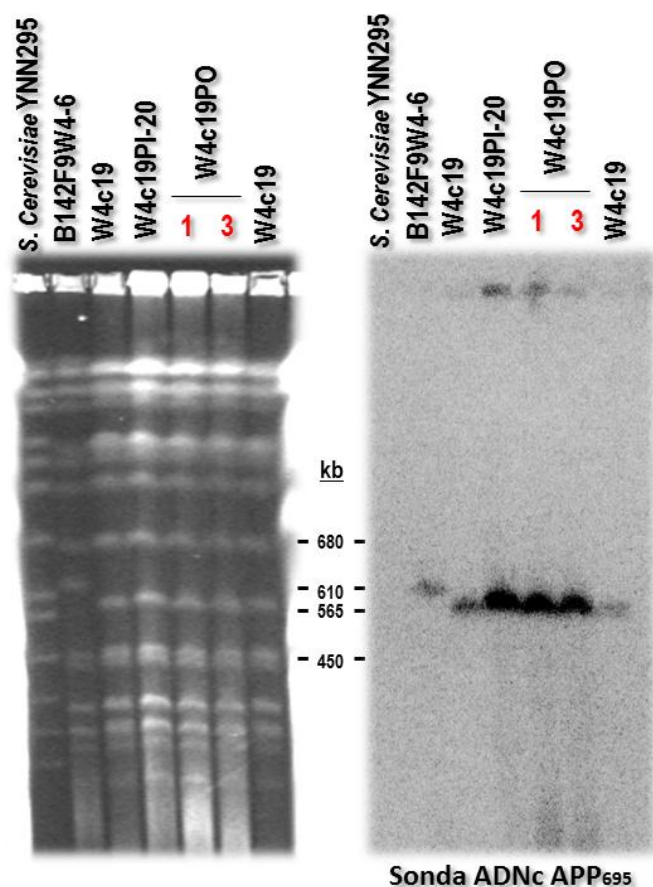
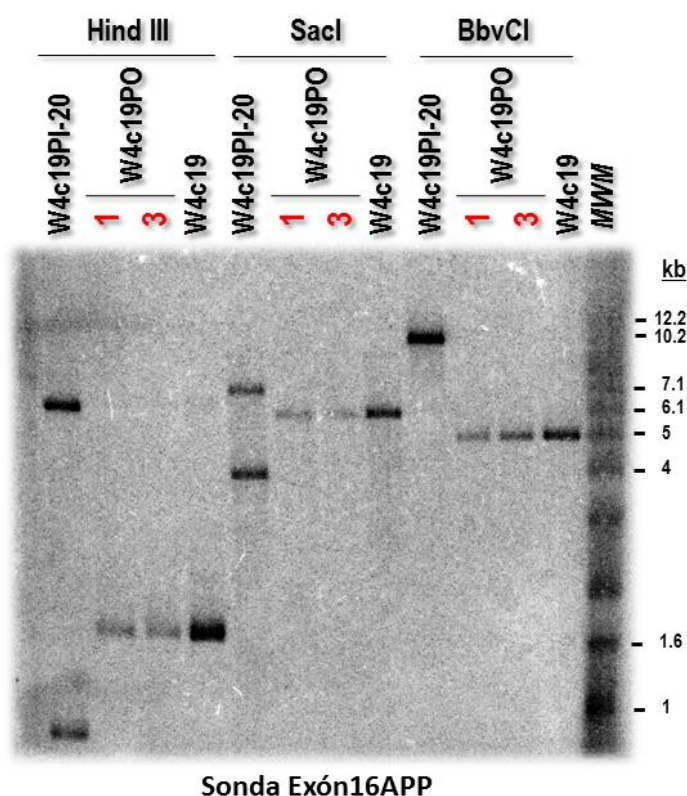


Figura R.31. Separación de cromosomas de levaduras mediante PFGE y posterior *Southern blot*. Análisis de los 2 clones W4c19PO-1 y 3. A la izquierda PFGE teñido con BrEt. A la derecha membrana hibridada con ADNc del gen *APP*. Se puede apreciar el ligero incremento de tamaño en el clon W4c19PI-20 debido a la introducción del plásmido de recombinación pRS306-gAPP16swe (5.2 kb). Sin embargo, en los clones W4c19PO-1 y 3 (en rojo) se puede apreciar que el tamaño de su YAC APPswe vuelve a ser del mismo que el del YAC APPwt de partida (565 kb) como era de esperar tras este último paso de recombinación, homóloga. *S.cerevisiae* YNN295 – marcador estándar de peso molecular.; B142F9W4-6 – clon portador del YAC APP-8; W4c19 – clon portador del YAC APPwt; W4c19PI-20 – clon portador del YAC APP-POP/IN.

Figura R.32. *Southern blot* de la región de recombinación. Diferencias en el patrón de las bandas del *Southern blot* entre los clones W4c19PO-1 y 3 (en rojo), que han sufrido este último paso de recombinación homóloga, y el clon W4c19PI-20 (YAC APP-POP/IN) tras la digestión con las enzimas de digestión *Hind* III, *Sac* I y *Bbv*CI, y posterior hibridación con la sonda exón16APP. Ambos clones muestran el patrón de bandas esperado (Figura R.22) tras una correcta recombinación homóloga y su coincidencia con el tamaño del clon de partida W4c19 (Figura R.19). *MWM* – marcador de peso molecular marcado radiactivamente.



Finalmente, para completar el estudio de validación estructural de los clones seleccionados, se realizó un nuevo *Southern blot* comparativo de los 2 clones mutantes. Se digirió el ADN genómico de diferentes clones utilizados en el estudio: B142F9, APPneoW4-1, W4c19, W4c19PI-20 y los clones W4c19PO-1 y 3 con la enzima de restricción *Bam*H I. Tras la electroforesis y transferencia a membrana, se hibridó usando la sonda del ADNc de la isoforma 695 del gen *APP*. En su posterior revelado se observó que el patrón teórico coincidía con la escalera de bandas obtenida para el clon original B142F9 y el resto de clones. La conservación de este patrón de bandas indica que la región codificante no ha sufrido grandes modificaciones ni reordenamientos en estos clones en las diferentes recombinaciones homólogas (Figura R.33).

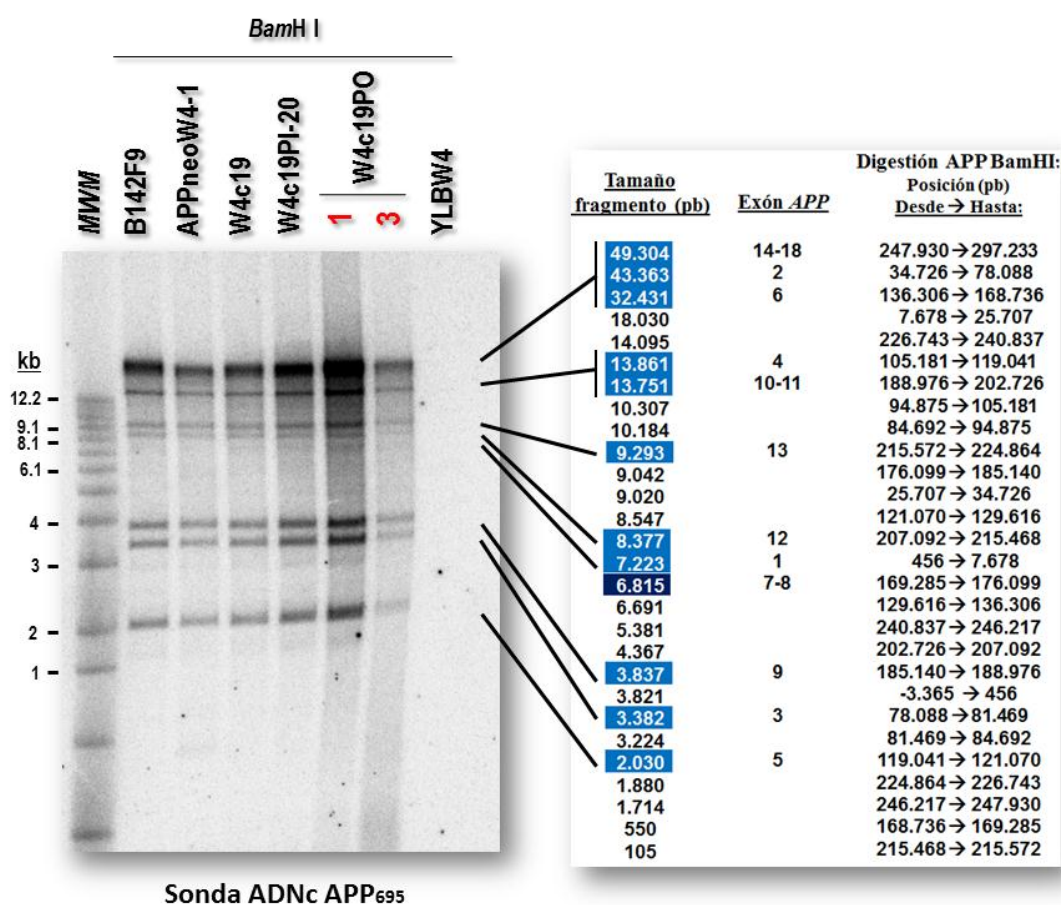


Figura R.33. Análisis por *Southern blot* comparativo de los clones W4c19PO que portan la mutación. Se digirió con la enzima de restricción *Bam*H I el ADN genómico de los diferentes clones utilizados en el estudio y de la levadura YLBW4 (control negativo) junto a los clones W4c19PO-1 y 3 a analizar. Se separaron en un gel de agarosa, se transfirieron a una membrana de nylon y finalmente se hibridaron con la sonda ADNc de la isoforma 695 del gen *APP*. A la derecha se puede ver el patrón de bandas teórico que se obtiene tras digerir el locus del gen *APP* con *Bam*H I, en azul aparecen marcados los fragmentos que contienen alguna región codificante del gen y a su derecha el exón que alberga ese fragmento. El fragmento marcado con azul oscuro alberga los exones 7 y 8, pero no hibrida porque la sonda es del ADNc de la isoforma 695, la cual sufre el procesamiento por *splicing* alternativo de estos exones. A la izquierda, el patrón obtenido tras el *Southern blot* y su coincidencia con el patrón de bandas teórico de los diferentes clones con los W4c19PO-1 y 3 (en rojo). MWM – marcador de peso molecular marcado radiactivamente; B142F9 – clon original portador del YAC APP-8; APPneoW4-1 – clon portador del YAC APPneo; W4c19 – clon portador del YAC APPwt; W4c19PI-20 – clon portador del YAC APP-POP/IN; YLBW4 – cepa *window 4* original.

En la **Figura R.34** se presenta un resumen de todos los pasos de recombinación homóloga realizados desde el clon B142F9 con el YAC APP-8 original hasta el clon portador del YAC con la mutación “Sueca” en el gen *APP*.

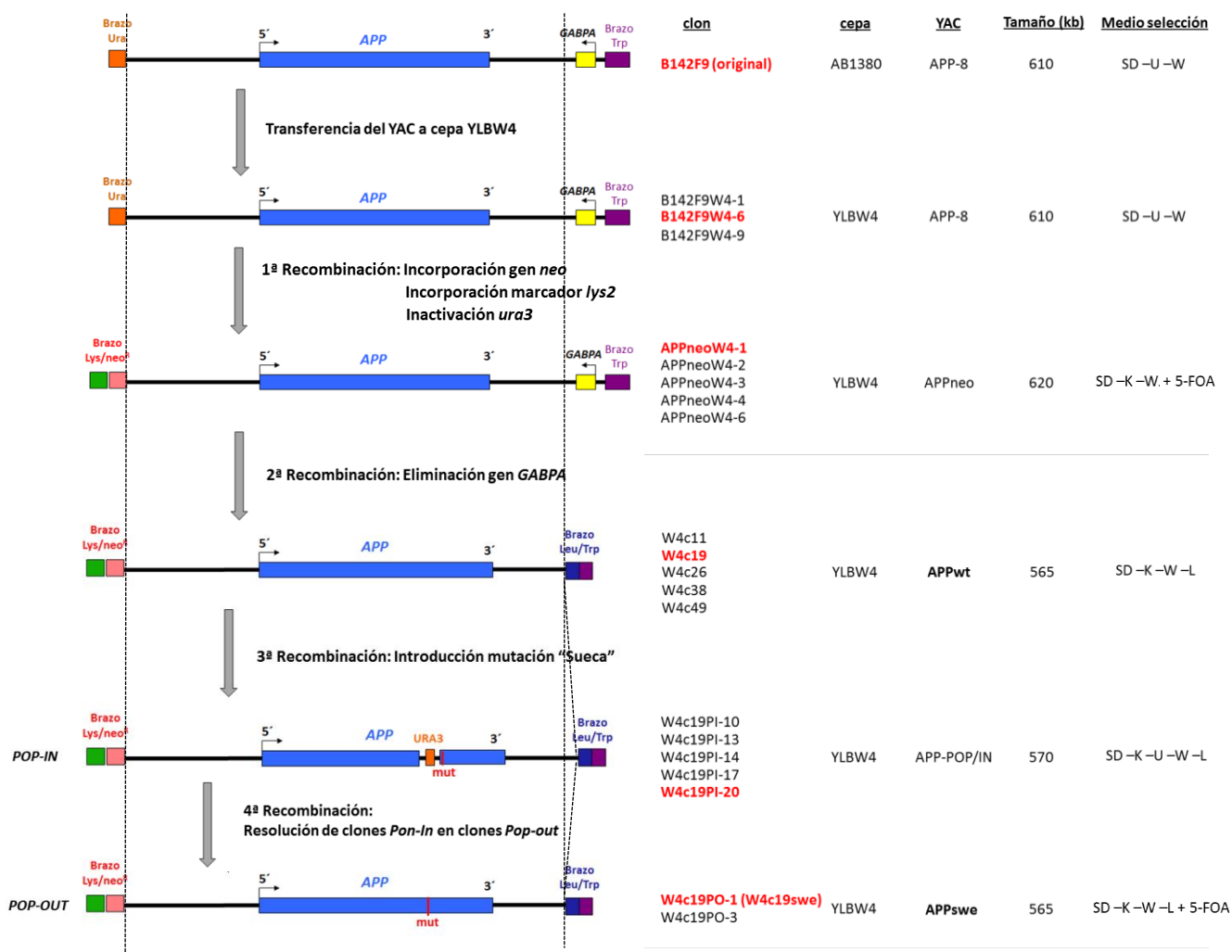


Figura R.34. Modificaciones de los diferentes YACs durante el estudio (Resumen). A la izquierda se observa el esquema de los diferentes YACs generados. La mutación “Sueca” en el exón 16 del gen *APP* aparece marcada con una línea y las palabra “mut” en rojo. A la derecha de cada esquema viene indicado el clon que lo porta, la cepa de la levadura, el nombre del YAC, su tamaño y el medio necesario para su selección según sus marcadores auxotróficos. Los clones marcados en rojo han sido los clones seleccionados para la sucesiva ronda de recombinación. En el caso del clon W4c19 y del clon W4c19PO-1, llamado a partir de ahora W4c19swe, por derivar del clon W4c19 y contener el YAC con la mutación “Sueca” (swe, del inglés *swedish*), se seleccionaron adicionalmente para la purificación de los YACs (en negrita) y posterior generación de ratones transgénicos.

4.3 PURIFICACIONES DE YACs

Se procedió a la purificación de los YACs APPwt y APPswe, que portaban los clones de levaduras W4c19 y W4c19PO-1 (W4c19swe) en la cepa de levaduras YLBW4 respectivamente siguiendo métodos establecidos (Schedl et al., 1993b; Giraldo, 2002; Fernandez et al., 2011). La purificación del YAC para el proceso de transgénesis es un proceso crítico. La calidad, integridad y concentración del mismo van a ser determinantes en la eficiencia de transgénesis. Se realizaron diferentes rondas de extracción de ADN para cada YAC siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4. En la **Figura R.35** se pueden observar los diferentes pasos de una de las purificaciones realizadas para el ADN del YAC APPwt a modo de ejemplo. Tras el paso de purificación, se midieron las concentraciones para cada una de las extracciones, obteniendo valores entre 5-10 ng/μl.

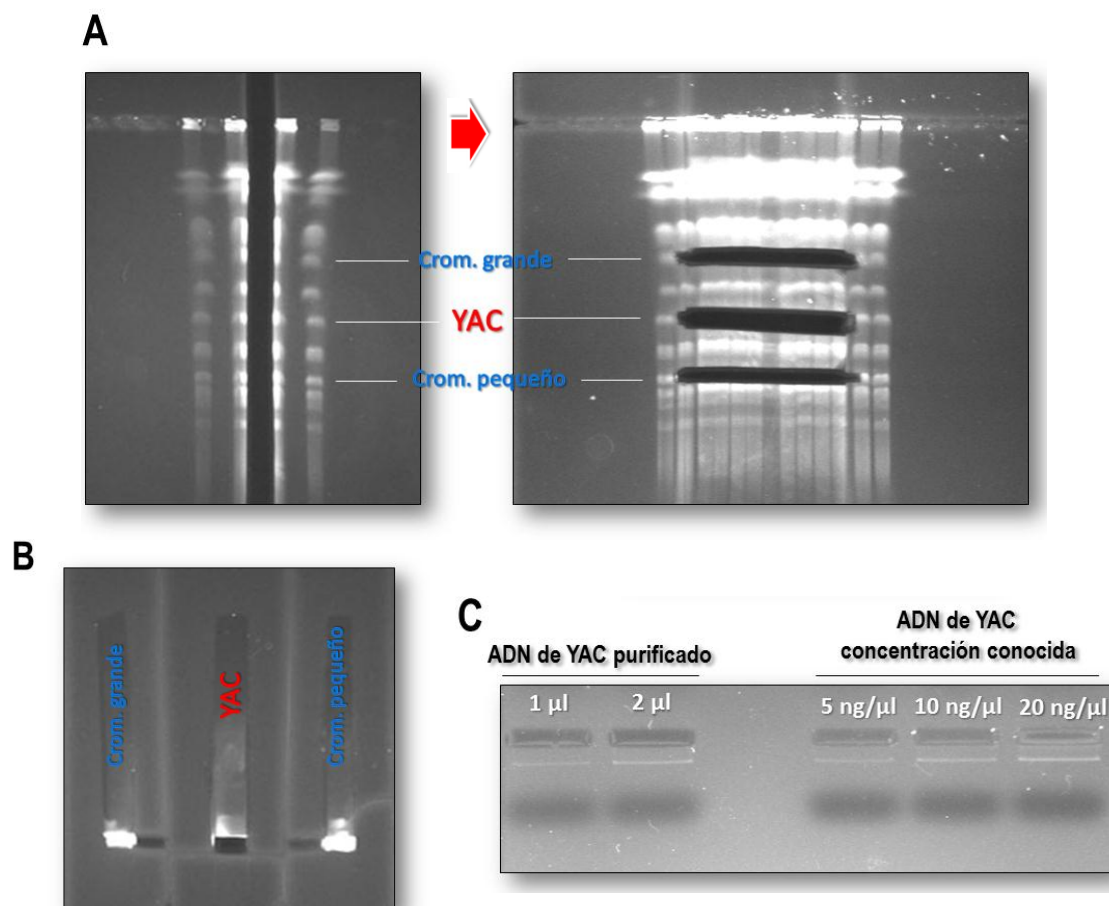


Figura R.35. Purificación de ADN del YAC. (A) A la izquierda se pueden ver los dos lados del PFGE teñidos con BrEt, utilizados para la localización del YAC. La parte central, que no se ve en la foto y que contiene el ADN a purificar, se corta usando como guía estos lados teñidos, extrayendo 3 tiras de agarosa correspondiente a un cromosoma endógeno de tamaño grande, otro de tamaño pequeño (en azul) y el YAC (en rojo). A la derecha se puede observar la recomposición del gel, después de teñir también la parte central, una vez extraídas las tiras de agarosa. (B) Se puede observar el segundo gel de electroforesis, teñido con BrEt, con las partes laterales y central. En la parte central se puede apreciar la extracción de un pequeño cubo de agarosa que corresponde al ADN concentrado del YAC después de la electroforesis de este segundo gel. (C) Análisis de la concentración del ADN del YAC purificado (pocillos de la izquierda), comparándolo, en un gel de electroforesis teñido con BrEt, con el ADN de un YAC de concentración conocida (pocillos de la derecha), usado como referencia, obtenido y cuantificado con anterioridad. En este caso la valoración de la concentración de ADN en esta muestra es de 5 ng/μl.

4.4 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS

4.4.1 GENERACIÓN DEL RATÓN APPwt

4.4.1.1 Microinyección del YAC APPwt en el pronúcleo de oocitos fecundados

Para la generación del ratón transgénico APPwt mediante microinyección en oocitos fecundados, se utilizó el YAC APPwt purificado a una concentración de 0.5-1 ng/μl, realizando para ello diferentes sesiones de microinyección (**Figura R.36** y **Tabla R.1**). Los ratones donantes de oocitos fecundados utilizados en la transgénesis fueron híbridos F1 entre CBA y C57BL/6JOLaHsd (B6CBAF1). En concreto, los oocitos fecundados microinyectados son B6CBAF2, con los que se obtienen mayores eficiencias de transgénesis que usando cepas consanguíneas (Auerbach et al., 2003).



Figura R.36. Microinyección de ADN del YAC APPwt en el pronúcleo de oocitos fecundados para la obtención de ratones transgénicos. La aguja de inyección, situada a la derecha, se introduce en el interior de uno de los pronúcleos (en el centro de la figura) e inyecta la solución con el ADN del YAC. Arriba se puede apreciar el corpúsculo polar, y rodeando al oocito la zona pelúcida. Fotografía cortesía de Alfredo Serrano (Servicio de Transgénesis del CNB-CBMSO-CSIC, Madrid).

La **Tabla R.1** se trata de una tabla resumen en la que se muestran los datos correspondientes a las 9 sesiones de microinyección del YAC APPwt, así como los ratones transgénicos obtenidos.

Ratones donadores de oocitos	YAC	Tamaño (kb)	Hembras superovuladas (SD)	Hembras con tapón vaginal (% SD)	Oocitos fecundados obtenidos (oocitos/hembra con tapón vaginal)	Oocitos fecundados microinyectados (% recuperados)	Embriones transferidos (% microinyectados)	Hembras pseudogestantes utilizadas (embriones/hembra)	Hembras gestantes y a término (% pseudogestantes)	Crias nacidas (% embriones transferidos)	Transgénicos identificados (% crías)	Transgénicos con el YAC intacto (% crías transgénicas)
B6CBAF1/OlaHsd	APPwt	565	6	3 (50)	239 (80)	114 (48)	69 (61)	3 (23)	3 (100)	9 (13)	0 (0)	-
			6	3 (50)	131 (44)	86 (66)	62 (72)	3 (21)	0 (0)	-	-	-
			6	3 (50)	179 (60)	55 (31)	29 (53)	1 (29)	0 (0)	-	-	-
			6	4 (67)	236 (59)	158 (67)	90 (57)	4 (22)	3 (75)	14 (16)	0 (0)	-
			6	4 (67)	182 (45)	121 (66)	91 (75)	4 (23)	3 (75)	15 (16)	0 (0)	-
			4	2 (50)	118 (59)	73 (62)	43 (59)	2 (21)	2 (100)	16 (37)	0 (0)	-
			6	3 (50)	214 (71)	167 (78)	112 (67)	5 (22)	5 (100)	34 (30)	2 (6)	0 (0)
			6	3 (50)	133 (44)	64 (48)	42 (66)	2 (21)	2 (100)	10 (24)	1 (10)	0 (0)
			8	6 (75)	228 (38)	128 (56)	98 (77)	4 (24)	4 (100)	29 (30)	2 (7)	2 (100)
B6CBAF1/OlaHsd	APPwt	565	54	31 (57)	1660 (54)	966 (58)	636 (66)	28 (23)	22 (79)	127 (20)	5 (4)	2 (40)

Tabla R.1. Datos de las diferentes sesiones de microinyección del YAC APPwt. La casilla en rojo representa los datos totales de las 9 sesiones realizadas. Se puede apreciar la eficiencia de transgénesis mediante microinyección para el YAC APPwt, que se sitúa en un 4% (5 ratones transgénicos en un total de 127 crías nacidas). Un 40% de los ratones transgénicos habían incorporado la secuencia completa del YAC (ver ANEXO 1).

4.4.1.1.1 Identificación y análisis de ratones transgénicos fundadores APPwt

La detección de los ratones transgénicos tras el proceso de microinyección se realizó mediante PCR. Debido a que el YAC APPwt es de gran tamaño (565 kb), se procedió a analizar la presencia de los dos brazos del cromosoma mediante una PCR doble (*lys2* y *trp1*), y la presencia de exones internos del gen *APP* mediante otra PCR doble (exones 3 y 11). Así, se analizaron los 127 ratones obtenidos tras la microinyección, obteniéndose PCRs positivas en 5 ratones (2376, 2396, 2574, 2670 y 2673) (**Figura R.37** y **Tabla R.1**), lo que sugiere que han integrado total o parcialmente el YAC.

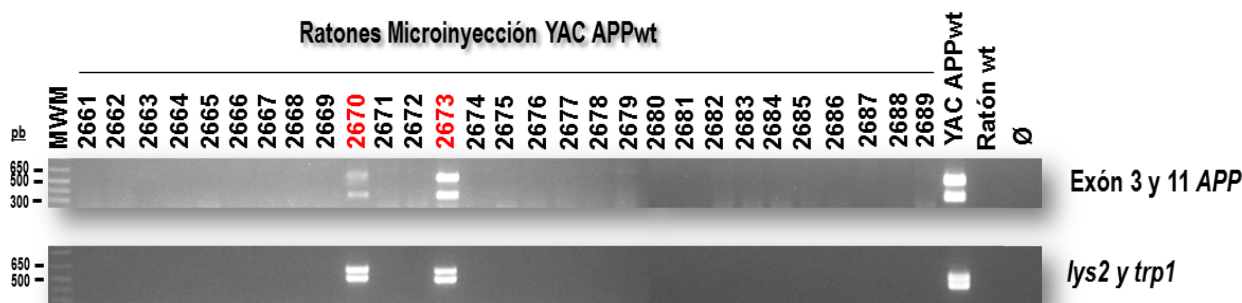


Figura R.37. Identificación mediante PCR de ratones transgénicos APPwt. Se muestra, a título de ejemplo, las PCRs realizadas a 29 ratones obtenidos en la última sesión de microinyección. Se trata de 2 PCRs dobles: la primera está diseñada para amplificar la región del exón 3 (313 pb) y la región del exón 11 (508 pb) del gen *APP*; la segunda está diseñada para amplificar el gen *lys2* (592 pb) presente en un brazo del YAC, y el gen *trp1* (488 pb) en el otro brazo. Se puede observar que de los 29 ratones analizados, el 2670 y 2673 (en rojo) salen positivos para todas las PCRs. De la misma forma se analizaron el resto de ratones obtenidos mediante microinyección, siendo finalmente positivos para alguna de las PCRs, además del 2670 y 2673, los ratones 2376, 2396 y 2574 (No se muestra la foto para estos últimos). *MWM* – marcador de peso molecular; *YAC APPwt* – Solución de ADN de YAC APPwt purificado. *Ratón wt* – Ratón silvestre. Ø – control sin ADN.

Posteriormente, para comprobar si la integración del YAC ha sucedido de forma total o parcial en estos 5 ratones, se decidió realizar un total de veintiocho PCRs diseñadas a lo largo de todo el YAC: dieciocho que correspondían a secuencias propias del gen *APP* como son el promotor y los 18 exones que componen dicho gen (una de ellas es capaz de amplificar el exón 12 y 13 conjuntamente); cuatro que correspondían a secuencias propias de ambos brazos del YAC, y seis que correspondían a secuencias localizadas entre el gen *APP* y los brazos del YAC tanto en el extremo 5' como en el 3'. Tras este análisis se observó que en 2 de los 5 ratones todas las PCRs eran positivas (2670 y 2673), lo que sugería que la integración había sido completa, constituyéndose los ratones transgénicos fundadores (F0) con el YAC APPwt. (**Figura R.38** y **Tabla R.2**)

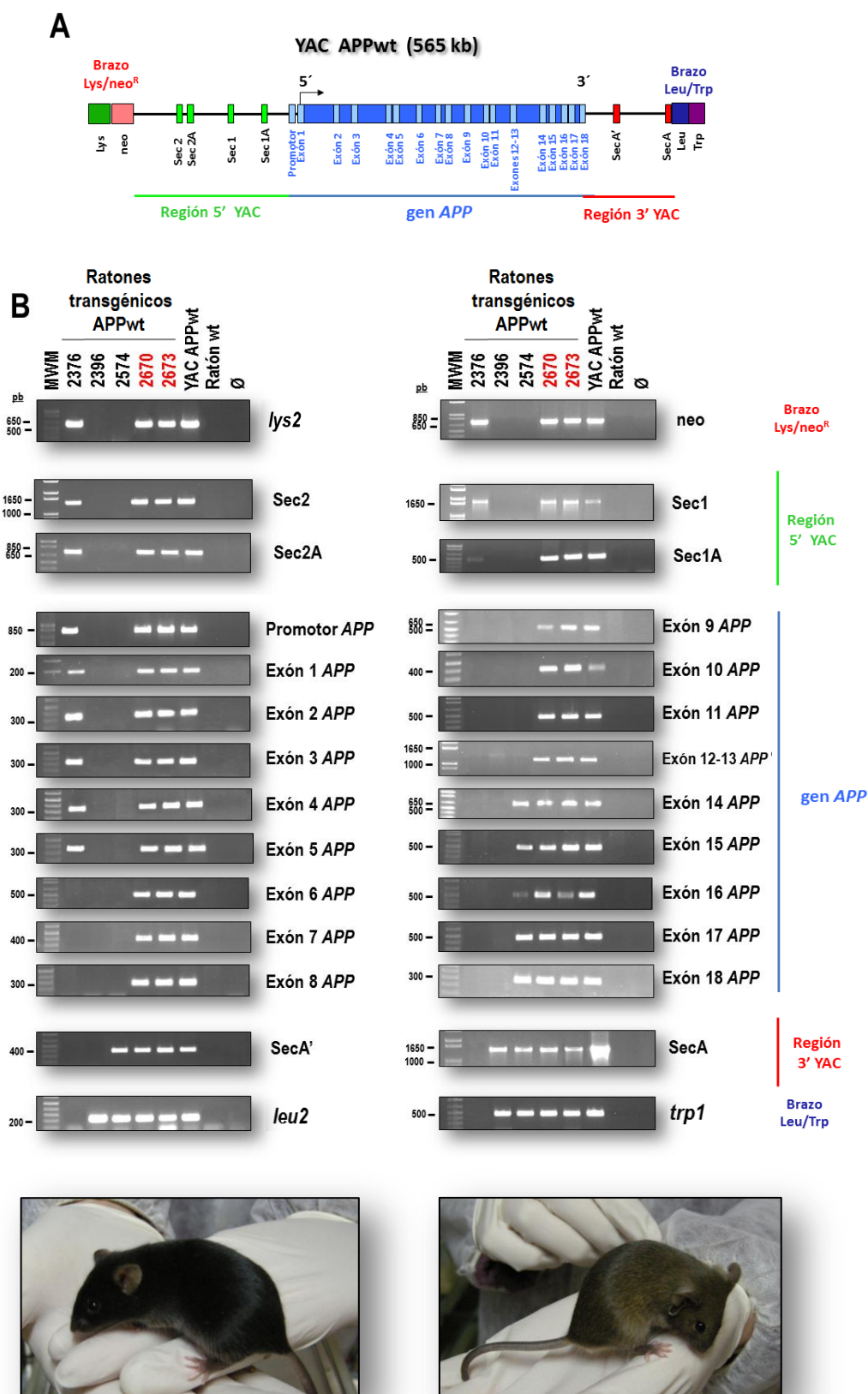


Figura R.38. Análisis mediante PCR de los 5 ratones transgénicos APPwt. (A) Esquema de las veintiocho PCRs diseñadas a lo largo de las 565 kb del YAC APPwt. (B) Se muestran estas veintiocho PCRs realizadas a los 5 ratones transgénicos (YAC APPwt) obtenidos por microinyección. Se puede observar que de los 5 ratones transgénicos, el 2670 y 2673 (en rojo) salen positivos para todas las PCRs, y esto sugiere que han integrado el YAC en su totalidad. Los ratones 2376, 2396 y 2574 son ratones transgénicos parciales. (C) A la izquierda el ratón 2670, a la derecha el ratón 2673. MWM – marcador de peso molecular; YAC APPwt – Solución de ADN de YAC APPwt purificado. Ratón wt – Ratón silvestre. Ø – control sin ADN.

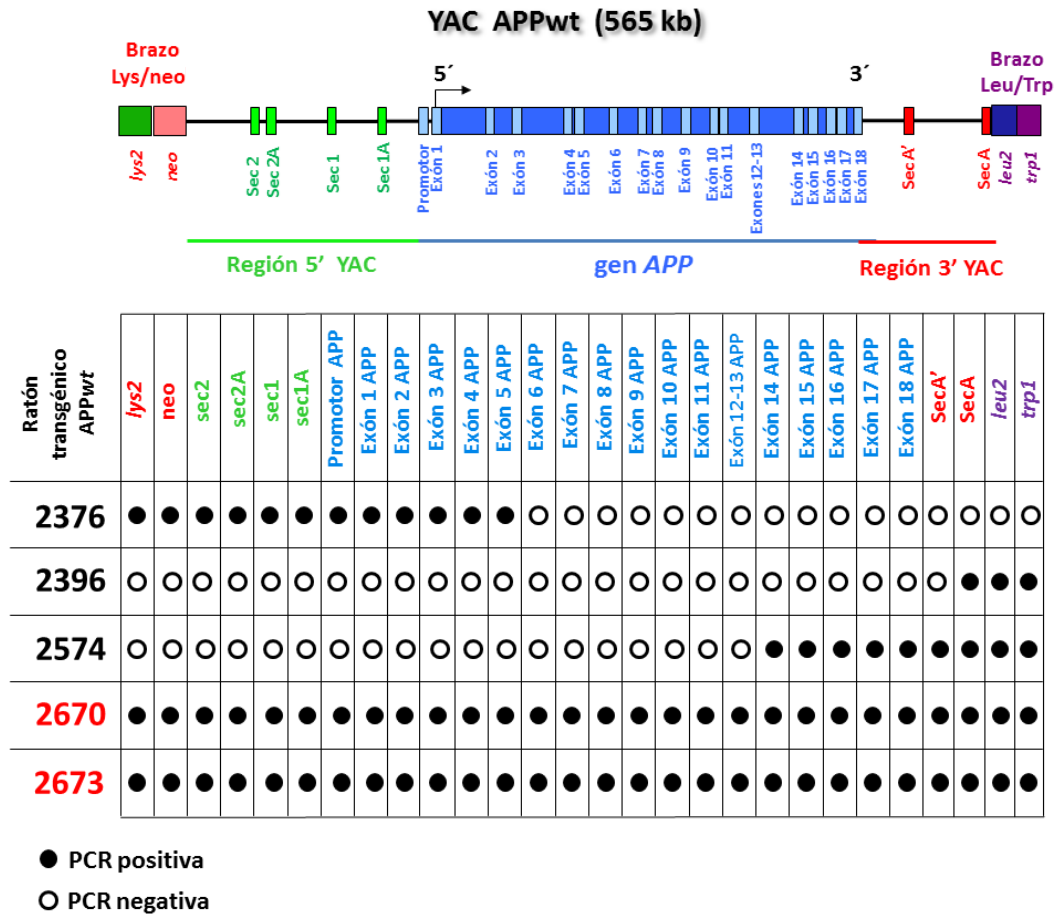


Tabla R.2. PCR de los 5 ratones transgénicos APPwt. El punto negro indica presencia y el punto sin relleno ausencia de la secuencia analizada mediante PCR. Se puede observar que de los 5 ratones transgénicos obtenidos, el 2376, 2396 y 2574 son ratones transgénicos parciales ya que no presentan la estructura completa del YAC, mientras que los ratones 2670 y 2673 (marcados en rojo) sí presentan la estructura completa, constituyéndose así los ratones fundadores (F0) de las líneas Tg2670 y Tg2673. Arriba se muestra un esquema del YAC APPwt donde aparecen representados los lugares aproximados de estas PCRs analíticas.

4.4.1.1.2 Transmisión del transgén YAC APPwt a la descendencia (F1)

Una vez contrastada mediante PCR la generación de dos ratones transgénicos fundadores aparentemente portadores de la totalidad del YAC, los individuos 2670 y 2673, se procedió a cruzarlos con ratones C57BL/6J0laHsd con el fin de comprobar la transmisión del transgén, que se encuentra en hemigiosis, a sus descendientes y analizar la expresión del mismo en ellos. Además, debido a que el transgén podría encontrarse integrado en cromosomas diferentes en forma de copias parciales solapantes, simulando ser una estructura intacta, indetectable mediante PCR, estos cruces permitirán averiguar, a través de la verificación de la cosegregación de todas las PCRs analíticas en los F1 obtenidos, si mantiene el YAC la integridad estructural.

La obtención de estos transgénicos se realizó en un fondo mixto, por lo que se hace necesaria la creación de una línea congénica portadora del transgén para futuros estudios conductuales

(Crawley, 2007), lo que implica un número de retrocruces con animales silvestres consanguíneos de fondo genético C57BL/6J^{OlaHsd}, siguiendo procedimientos estándar establecidos (Silver, 1995):

<http://www.informatics.jax.org/silver/frames/frame3-3.shtml>

Para este estudio de transmisión del YAC APP^wt se realizaron primero tres PCRs a los descendientes obtenidos [generación filial 1 (F₁)]: se procedió a analizar la presencia de los dos brazos del YAC mediante dos PCRs (*lys2* y *trp1*), y una PCR del exón 6 del gen *APP*. Así, se analizaron 49 descendientes del ratón 2670, identificándose 4 ratones transgénicos, lo que implicaba una transmisión del 8%. En el caso del ratón 2673, se analizaron 28 descendientes, obteniendo 1 ratón transgénico, lo que implica una transmisión del 4% (**Tabla R.3**). En los dos casos, el índice de transmisión del transgén a la primera generación de descendientes no se corresponde a un patrón de herencia Mendeliano debido posiblemente a que la integración del transgén en el genoma se produce después de la primera replicación del ADN cromosómico (Whitelaw et al., 1993) provocando mosaicismo en los fundadores ya que no todas las células han incorporado el transgén. Estadísticamente se comprobó el mosaicismo de los dos fundadores (Montoliu, 2012) mediante el test de la ji-cuadrado. En la **Figura R.39** se representa una PCR ilustrativa de varias crías del ratón 2670.

YAC	Fondo genético de ratón	Línea transgénica	Sexo (H/M) y transmisión a la línea germinal (TG/crías F ₁)	Patrón Mendeliano o Mosaicismo (test ji-cuadrado) [%]
APP ^w t	B6CBAF2/OlaHsd	Tg2670	M: Sí (4/49)	Mosaicismo
APP ^w t	B6CBAF2/OlaHsd	Tg2673	M: Sí (1/28)	Mosaicismo

Tabla R.3. Transmisión a la F₁ del YAC APP^wt en las líneas Tg2670 y Tg2673. H, Hembra; M, macho; TG, transgénico; (%) resultados del "test ji-cuadrado" obtenidos de "Mendel" Excel workbook (Montoliu, 2012).

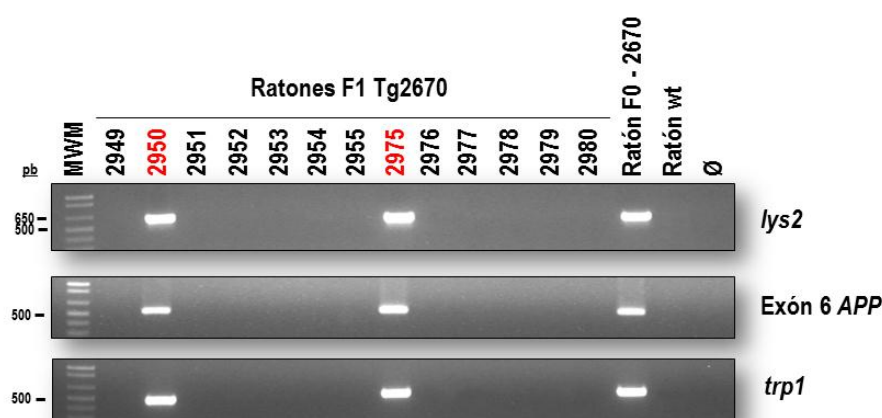


Figura R.39. Análisis mediante PCR de la transmisión a la línea germinal del YAC APP^wt en el Tg2670. Se representa, a modo de ejemplo, la imagen de las tres PCRs realizadas a las 13 primeras crías del ratón 2670. Se puede observar que las crías 2950 y 2975 (en rojo) han heredado el transgén. MWM – marcador de peso molecular; Ratón F0-2670 – Ratón fundador línea Tg2670; Ratón wt – Ratón silvestre; Ø – control sin ADN.

A continuación, para comprobar que la estructura del YAC está intacta en los 4 ratones F1 de la línea Tg2670 y en el ratón F1 de la línea Tg2673, se decidió realizar las mismas veintiocho PCRs analíticas diseñadas a lo largo de todo el YAC que se hicieron con los ratones transgénicos obtenidos tras la microinyección. Tras este análisis se observó que todos los ratones analizados eran positivos para todas las PCRs, lo cual indicaba la cosegregación de todos los fragmentos del YAC y sugería su integridad estructural, constituyéndose definitivamente las dos líneas transgénicas Tg2670 y Tg2673.

Para completar el estudio genómico de los ratones transgénicos F1 obtenidos tras el cruzamiento de sus fundadores, se decidió verificar la estructura del YAC APP^{wt} mediante *Southern blot* comparativo de los descendientes de los dos ratones fundadores. Debido a que el gen *App* murino presenta un alto grado de homología en la región codificante con el gen *APP* humano, no se pudo realizar el análisis de la región codificante mediante hibridación con sonda del ADNc del gen *APP* humano tal y como se hiciera en el análisis de los clones de levaduras (apartado 4.2.1.2.). En esta ocasión se digirió, con la enzima de restricción *Hind* III, el ADN genómico del clon W4c19 de levadura y los diferentes ADN genómicos de los ratones F0 y F1 obtenidos. Tras la electroforesis y transferencia a membrana, se hibridó con sondas *Alu* exclusivas del genoma humano, que corresponden a elementos repetitivos humanos que se encuentran a lo largo de todo el genoma (Schmid & Deininger, 1975). Así, se debe obtener un patrón de bandas para el YAC que debería ser el mismo para todas las muestras analizadas si mantiene la estructura intacta una vez insertado en el genoma de ratón (técnica de *FingerPrint*) (Jakobovits et al., 1993). En la **Figura R.40** puede observarse el patrón de bandas obtenido para el clon W4c19, portador del YAC APP^{wt}, y su coincidencia con el patrón obtenido para el ratón fundador 2670 y uno de sus descendientes transgénicos (2950); y el ratón fundador 2673 y su descendiente transgénico (2969), lo cual sugería que no se habían producido grandes alteraciones o reordenaciones en el YAC integrado en el genoma de ratón.

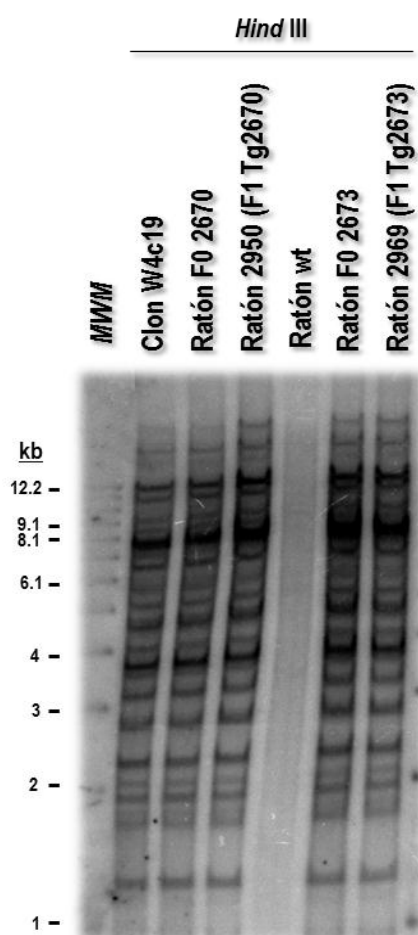


Figura R.40. *Southern blot* comparativo del clon W4c19 y los ratones transgénicos F0 y F1 mediante el uso de elementos *Alu* humanos (*FingerPrint*). Se digirió con la enzima de restricción *Hind* III el ADN genómico del clon de levaduras W4c19 (control positivo), de un ratón silvestre (ratón wt - control negativo), de los ratones fundadores 2670 y 2673 y de un descendiente (F1) de cada uno de ellos, el 2950 (F1 del ratón 2670) y el 2969 (F1 del 2673). Se separaron en un gel de agarosa, se transfirieron a una membrana de nylon y finalmente se hibridaron con sondas de elementos repetitivos *Alu* humanos. Se puede apreciar el patrón de bandas obtenido tras el *Southern blot* en el clon W4c19 y su coincidencia con el patrón de bandas obtenido para los diferentes ratones. *MWM* – marcador de peso molecular marcado radiactivamente; Clon W4c19 – clon portador del YAC APPwt.

Sondas *Alu* repetitivas humanas

4.4.1.1.3 Análisis de la expresión del gen *APP* humano en las líneas Tg2670 y Tg2673

Una vez comprobada la transmisión y, por ende, la integridad estructural del YAC APPwt en las líneas transgénicas Tg2670 y Tg2673, era necesario caracterizar los niveles de expresión del gen *APP* humano en ambas líneas. El estudio se realizó tanto a nivel de ARN como de proteína. Para este análisis se usaron ratones correspondientes a la segunda generación (F2) de la línea Tg2670 y Tg2673, utilizando machos y hembras de dos a cuatro meses de edad para cada una de las líneas, y comparándolos con hermanos de camada no transgénicos. El estudio se centró en el sistema nervioso central debido a que es el tejido involucrado en los procesos patológicos de la enfermedad de Alzheimer, además de que es el tejido donde se produce una mayor expresión del gen *APP* (Tanzi et al., 1987; Neve et al., 1988).

El primer paso para la comprobación de la correcta expresión del gen *APP* humano en las líneas Tg2670 y Tg2673 consistió en la constatación mediante RT-PCR de la transcripción del gen *APP* humano en el cerebro del ratón. Para ello se extrajo el ARN mensajero (ARNm) de cerebro de

ratón y se midió el nivel de transcripción del ARN mediante RT-PCR cuantitativa, usando una sonda *Taqman* dirigida al gen *APP* humano [*Assay-on-Demand* (Applied Biosystems) (código: Hs00169098-M1)]. Como control interno de este experimento, se utilizó el gen endógeno *18S* ARNr [*Assay-on-Demand* (Applied Biosystems) (código: hs99999901_S1)]. Para completar el estudio, se midieron también los niveles de ARNm del gen *App* murino [*Assay-on-Demand* (Applied Biosystems) (código: Mm00431827-M1)], de forma que se pueden comparar los niveles de expresión de ambos genes una vez normalizados con el gen *18S*.

En la **Figura R.41** se representan los niveles de expresión relativa del gen *APP* humano y del gen *App* murino en el cerebro para un grupo de 5 ratones transgénicos de la línea Tg2670, 5 ratones transgénicos de la línea Tg2673 y 4 ratones hermanos de camada no transgénicos (2 de la línea Tg2670 y 2 de la línea Tg2673). Se puede observar que existe expresión del gen *APP* humano en ambas líneas transgénicas y ningún tipo de expresión en los ratones silvestres, pero al compararlo con el nivel de expresión del gen *App* murino se observa que es mucho menor; obteniéndose un 2.2% de expresión del gen *APP* humano respecto al gen *App* murino para la línea Tg2670, y de 1.7% en la línea Tg2673 (**Figura R.41** y **Tabla R.8**).

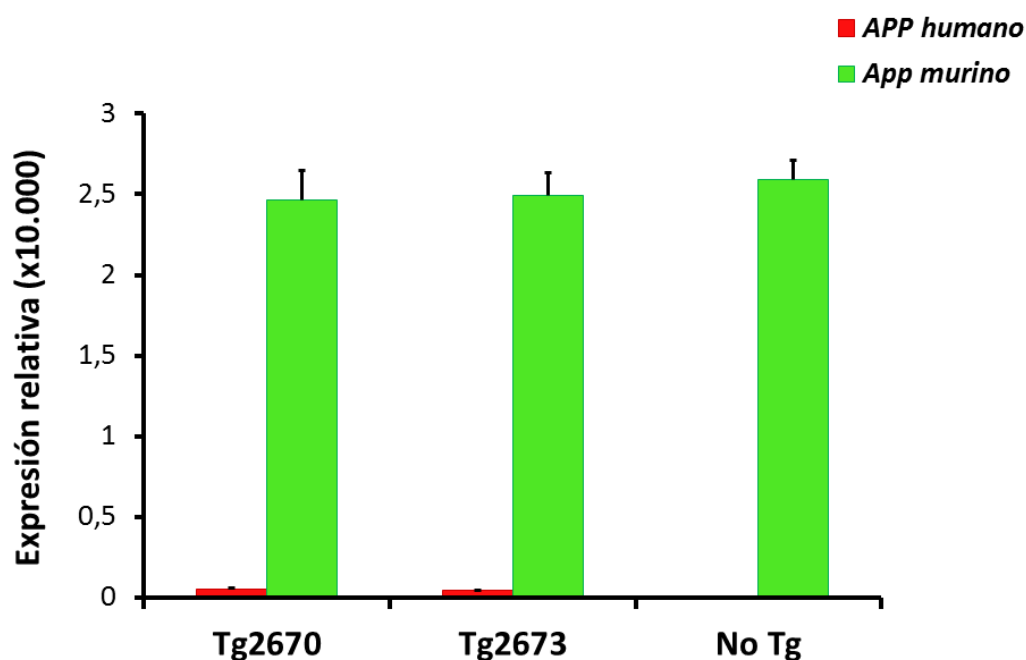


Figura R.41. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de *APP* humano (rojo) y *App* murino (verde) en cerebros de ratones transgénicos (Tg2670 y Tg2673). El grupo de ratones Tg2670 está compuesto por 3 machos y 2 hembras (n=5) transgénicos de la segunda generación filial (F2) de tres meses de edad. El grupo de ratones Tg2673 está compuesto por 2 machos y 3 hembras (n=5) transgénicos, de la F2 de tres meses de edad. El grupo de ratones no transgénicos (No Tg) son 4 hermanos de camada (n=4) de ambas líneas (1 macho y 1 hembra de cada uno). Se puede observar que existe expresión del gen *APP* humano en ambas líneas transgénicas, pero con niveles de expresión muy bajos comparados con los del gen *App* murino. El eje Y representa los niveles de expresión relativa de ambos genes (multiplicado por 10.000) normalizados con el gen *18S*. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado.

Debido a que los niveles de expresión del gen *APP* humano son muy bajos en comparación con los del gen *App* murino en los cerebros, no se decidió abordar el estudio en subdivisiones de dicho cerebro ni en diferentes órganos del ratón.

El siguiente paso consistió en intentar detectar la proteína APP humana en ambas líneas transgénicas mediante la técnica de inmunomarcado después de electrotransferencia proteica (*western blot*). Para ello se realizó la extracción de proteínas a partir de homogeneizado de cerebro de ratón, se cuantificó la cantidad de proteína y se analizaron 50 µg para 3 de los 5 ratones analizados mediante RT-PCR, tanto para la línea Tg2670 como para la Tg2673. Además, se añadió 1 hermano de camada no transgénico de cada uno, un control positivo, consistente en un ratón comercial (Tg2576) capaz de expresar el gen *APP* humano a partir de una construcción que contiene el ADNc de la isoforma 695 dicho gen controlado por el promotor del gen de la proteína priónica (PrP) de hámster (Hsiao et al., 1996); y un control negativo, consistente en un ratón silvestre C57BL/6J. En cuanto al control positivo, se decidió analizar 15 y 7.5 µg (frente a los 50 µg del resto de muestras) de proteínas de homogeneizado de cerebro, debido a que este ratón es capaz de sobreexpresar 5.5 veces el gen *APP* humano respecto al endógeno. Para la detección de la proteína APP humana se utilizó el anticuerpo monoclonal 6E10 (Covance), que es capaz de distinguir entre la forma humana y la murina; y como control de carga de las muestras se utilizó la proteína α -tubulina.

En la **Figura R.42** se puede observar un *western blot* representativo de ambas líneas transgénicas. Como se puede apreciar, ni la línea Tg2670, ni la línea Tg2673 muestran niveles de proteína APP humana detectables en cerebro mediante la técnica de *western blot* (**Figura R.42** y **Tabla R.8**), corroborando los bajos niveles de expresión observados mediante RT-PCR.

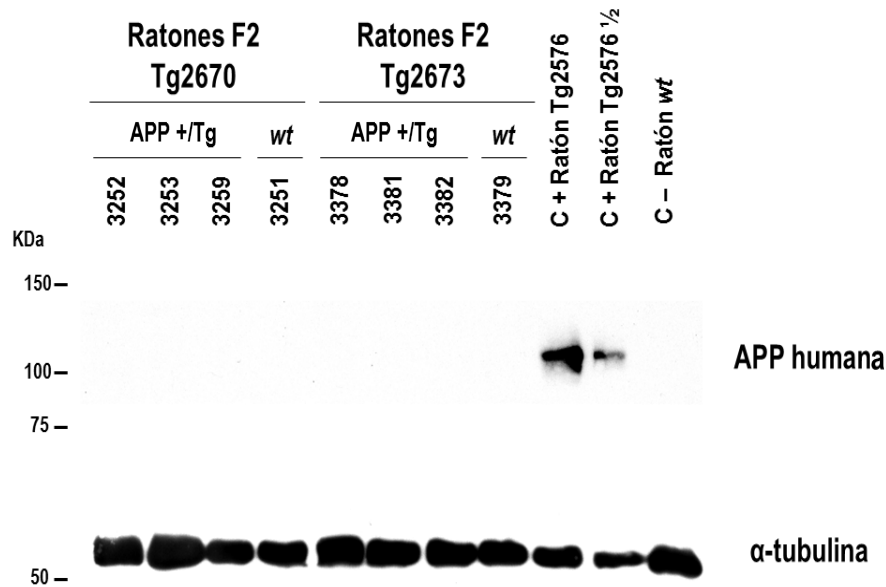


Figura R.42. Detección de proteína APP humana mediante *western blot* en cerebros de ratones transgénicos (Tg2670 y Tg2673). El grupo de ratones Tg2670 y Tg2673 está compuesto por 3 ratones transgénicos (APP +/Tg) y un hermano de camada no transgénico (wt) de la segunda generación filial (F2) de tres meses de edad. Se analizaron 50 µg de proteínas totales extraídas de homogeneizado de cerebro de ratón, excepto para el control positivo que se analizaron 15 µg y 7.5 µg (½). En ningún ratón, de las dos líneas transgénicas generadas, fue capaz de detectarse proteína APP humana mediante esta técnica de *western blot*. C+ Ratón Tg2576 – Control positivo, ratón comercial capaz de sobreexpresar 5.5 veces el gen *APP* humano respecto al murino. C – ratón wt – Ratón silvestre C57BL/6J.

4.4.1.1.4 Nomenclatura oficial de los ratones transgénicos Tg2670 y Tg2673

De acuerdo a las recomendaciones del Comité Internacional para la Nomenclatura genética estandarizada de ratones (<http://jaxmice.jax.org/support/nomenclature/index.html>) (Montoliu & Whitelaw, 2011) los ratones transgénicos Tg2670 y Tg2673 generados tienen la siguiente nomenclatura oficial:

B6;CBA-Tg(*APP*)2670Lmon

B6;CBA-Tg(*APP*)2673Lmon

4.4.1.2 Transfección de células embrionarias pluripotentes de ratón y posterior generación de ratones quiméricos

Una vez comprobado que en ninguna de las líneas transgénicas obtenidas mediante microinyección con el YAC APPwt (Tg2670 y Tg2673) se detectaba proteína APP, se decidió abordar el estudio mediante la transfección de nuestro YAC APPwt en células embrionarias pluripotentes (células ES) de ratón (*Bruce4*, que deriva de la cepa de ratón C57BL/6) (Köntgen & Stewart, 1993; Hughes et al., 2007).

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Unidad de Transgénesis del Programa de Biotecnología del CNIO en Madrid, bajo la dirección de la Dra. Sagrario Ortega.

Se ha descrito con anterioridad que la introducción del YAC original de APP, el YAC APP-8, en células ES permite la expresión del gen *APP* humano en éstas, pudiéndose seleccionar con ello los clones de células ES más apropiados y prácticamente asegurar la generación de un ratón, con el uso de éstas, capaz de expresar el transgén con niveles adecuados (Lamb et al., 1993).

El primer paso consistió en un análisis del plásmido pRV1, que se encuentra integrado en el YAC APPwt, y que contiene, para la selección después de la transfección en células de mamífero, el gen de resistencia a neomicina bajo el control del promotor de la metalotioneína-I (MT-1) de ratón. Se llevó a cabo una transfección de las células ES con el plásmido pRV1 con el fin de analizar la eficiencia en el proceso de selección de los nuevos clones; observándose que al utilizar medio suplementado con el antibiótico G418 (Geneticin®, Invitrogen) a una concentración de 200 µg/ml, concentración habitual utilizada en los procesos de selección de células ES (Huszar et al., 1985), no se obtenían colonias resistentes, y concluyéndose que dicho promotor no era óptimo para el proceso de selección en células ES. Debido a esto, se decidió realizar una cotransfección del YAC APPwt con el vector pPNT (Tybulewicz et al., 1991), que contiene también el gen *neo*, pero controlado por el promotor del gen *Pgk-1* de ratón, el cuál presenta una eficiencia mayor en el proceso de selección. En cuanto a la cantidad de ADN usado en la cotransfección, se utilizaron las siguientes cantidades: 500 ng de YAC + 5 ng de vector, 500 ng de YAC + 10 ng de vector, 500 ng + 20 ng de vector y 500 ng de YAC + 40 ng de vector; obteniéndose finalmente un total de 225 clones capaces de crecer en medio suplementado con G418 a una concentración de 200 µg/ml.

4.4.1.2.1 Identificación de células ES portadoras del YAC APPwt

La detección de las células ES portadoras del YAC APPwt tras el proceso de cotransfección se realizó mediante PCR de secuencias propias del YAC. Se procedió a analizar la presencia de secuencias de los dos brazos del YAC (*lys2* y *trp1*) y de diferentes exones del gen *APP* (exón 3 y 12-13). Así, se analizaron los 225 clones de células ES, siendo positivos, para al menos una de las PCRs, 12 clones, lo que significa que un 5% de los clones capaces de crecer en G418 han cointegrado el vector y el YAC de forma total o parcial. De estos 12 clones, 4 fueron positivos para todas las PCRs (clones 7, 25, 86 y 100) (**Figura R.43**).

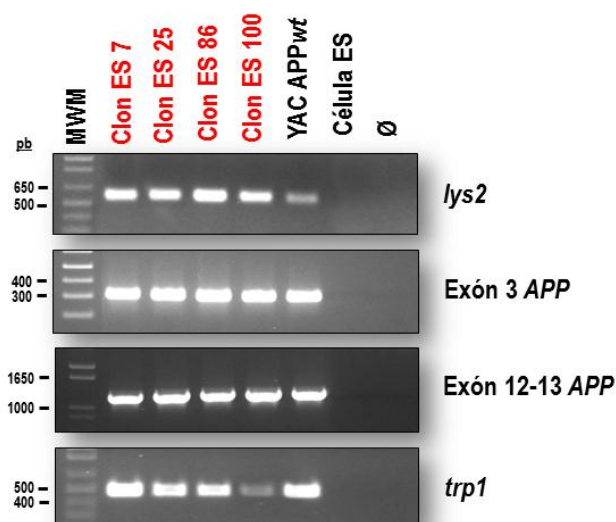


Figura R.43. Identificación mediante PCR de células ES portadoras del YAC APPwt. Imagen de las cuatro PCRs realizadas a los clones 7, 25, 86 y 100 (en rojo) de células ES. Se puede observar que los 4 clones fueron positivos para todas las PCRs. MWM – marcador de peso molecular; YAC APPwt – Solución de ADN de YAC APPwt purificado (control positivo). Célula ES – Célula ES *Bruce4* sin transfectar (control negativo). Ø – control sin ADN.

4.4.1.2.2 Análisis de la expresión del gen *APP* humano en células ES

De los 4 clones que fueron positivos para todas las secuencias analizadas mediante PCR, se les realizó un análisis de la expresión del gen *APP*, tanto a nivel de ARNm como de proteína de la misma forma que se procedió para el análisis de los ratones Tg2670 y Tg2673 (apartado 4.4.1.1.3.). Así se observó que, a nivel de ARNm, de los 4 clones analizados, 3 eran capaces de expresar el gen *APP* humano (clones ES 25, 86 y 100), obteniéndose un nivel de expresión del 355% del gen *APP* humano respecto al gen *App* murino en el clon ES 25, del 29% para el clon ES 86 y de 0.5% para el clon ES 100. En el clon ES 7 no se logró detectar expresión del gen *APP* humano (**Figura R.44**).

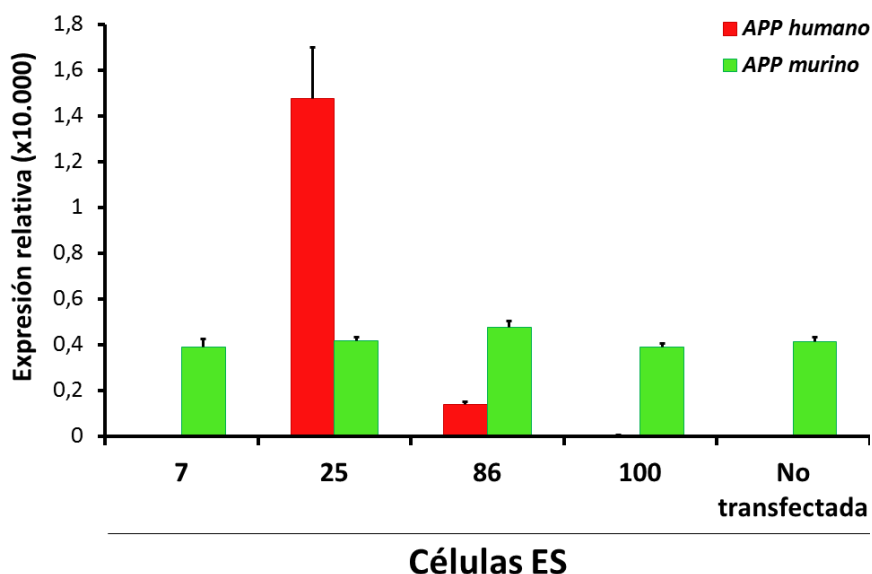


Figura R.44. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de *APP* humano (rojo) y *App* murino (verde) en células ES. Se puede observar que existe expresión del gen *APP* humano en 3 (clon ES 25, 86 y 100) de los 4 clones que portan el transgén, siendo los niveles de expresión muy elevados en el clon ES 25 en comparación con el *App* endógeno de la célula, relativamente bajos para el clon ES 86, y prácticamente insignificantes para el clon ES 100. Como control negativo se utilizaron células ES que no habían sido transfectadas. El eje Y representa los niveles de expresión relativa de ambos genes (multiplicado por 10.000) normalizados con el gen 18S. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar de dos experimentos realizados por triplicado.

Mediante *western blot* y usando de nuevo el anticuerpo monoclonal 6E10, que reconoce únicamente la proteína APP humana, se pudo detectar la presencia de proteína APP humana en los clones de células ES 25, 86 y 100, encontrando los mayores niveles de proteína en el clon ES 25, y los menores en el clon ES 100 (**Figura R.45**), coincidiendo con los resultados de análisis de expresión obtenidos mediante RT-PCR.

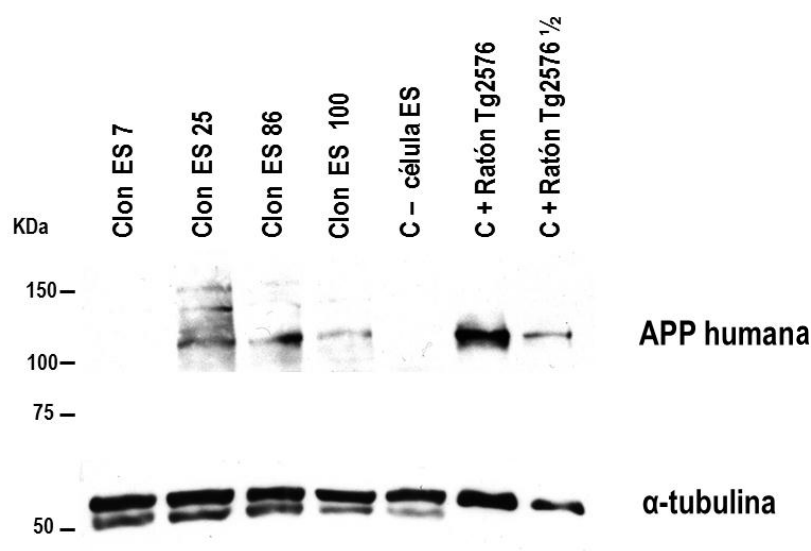


Figura R.45. Detección de proteína APP humana mediante *western blot* en células ES. Se analizaron 50 μ g de proteínas obtenidas de lisado celular de los diferentes clones, excepto para el control positivo que se analizaron 15 μ g y 7.5 μ g ($\frac{1}{2}$) de proteína de homogeneizado de cerebro de ratón. Como se puede apreciar, se detectó proteína APP humana en los clones ES 25, 86 y 100, obteniendo los mayores niveles de proteína para el clon ES 25. El clon ES 7 no presenta acúmulo alguno de proteína APP humana. C+ Ratón Tg2576 – Control positivo, ratón comercial capaz de sobreexpresar 5.5 veces el gen *APP* humano respecto al murino. C – célula ES – Control negativo, célula ES *Bruce4* no transfectada.

4.4.1.2.3 Generación de ratones quiméricos a partir del clon 25 de células ES

De los resultados anteriores, se decidió seleccionar el clon ES 25 debido a que era el clon que presentaba mayores niveles de expresión del gen *APP* tanto a nivel de ARNm como de proteína. Antes de proceder a la generación del ratón quimérico se realizó, en este clon ES 25, una hibridación fluorescente in situ (FISH), concretamente un SKY (Spectral Karyotyping), que permitió realizar un cariograma y comprobar que el clon ES 25 no contenía ninguna anomalía cromosómica. Se ha descrito que el cultivo en placa de estas células puede crear aberraciones cromosómicas (Longo et al., 1997; Carstea et al., 2009) que como resultado final provocan que posteriormente no haya contribución de estas células ES en la línea germinal del ratón quimérico (Liu et al., 1997; 1998).

Se procedió a la generación de embriones quiméricos por medio de la inyección de 5-7 células ES del clon 25 en el blastocelo de blastocistos (en un total de 145 blastocistos) (**Tabla R.4**). La cepa de ratón donante de blastocistos elegida fue la cepa [B6(Cg)-Tyr^{c-2J}/J] (Jackson Laboratory) que contiene, en homocigosis, una mutación espontánea que inactiva el gen que codifica la enzima tirosinasa (Tyr), resultando en un fenotipo albino. Esta estrategia permite la visualización de dos colores en el pelaje de los ratones quiméricos, debido a que las células ES *Bruce4* que se utilizaron en el estudio procedían de una cepa pigmentada (C57BL/6). Finalmente, estos embriones se transfirieron a hembras receptoras pseudogestantes CD-1 y se dejaron desarrollar a término. Si las células ES portadoras del YAC son capaces de colonizar el embrión receptor, contribuirán a la formación de tejidos y órganos del nuevo individuo, obteniendo así los ratones quiméricos.

Clon célula ES (Genotipo)	YAC	Tamaño (kb)	Donantes (hembras con tapón vaginal) Cepa de ratón	Blastocistos inyectados	células ES 25 inyectadas por blastocisto	Embriones transferidos (% inyectados)	Crias nacidas (% embriones transferidos)	Quimeras (% crías)	Sexo quimera (% aproximado contribución al color del pelaje)	Nº quimera y transmisión a la línea germinal: pigmentación (crias PG/crias totales)	Transmisión a la línea germinal: YAC (TG/crias PG)	Patrón de herencia (test ji cuadrado)%
Clon ES 25 (C57BL/6J)	APPwt	565	12 (11) B6 albino	62	6-10	62 (100)	3 (5)	0 (0)	-	-	-	-
			7 (6) B6 albino	29	5	29 (100)	9 (31)	2 (22)	1 M (30); 1 H (30)	9114: Sí (23/24); 9117: No (0/22)	Sí (10/23)	Mendeliano
			6 (4) B6 albino	20	5	20 (100)	6 (30)	1 (17)	1 H (40)	9118: No (0/16)	-	-
			8 (6) B6 albino	34	5	34 (100)	10 (29)	3 (30)	1 M (10); 1 M (60); 1 H (30)	9115: No (0/28); 9116: Sí (13/14); 9119: No (0/13)	Sí (8/13)	Mendeliano
Clon Es 25 (C57BL/6J)	APPwt	565	33 (27) B6 albino	145	5	145 (100)	28 (19)	6 (21)				

Tabla R.4. Datos de las diferentes sesiones de inyección de las células ES 25 y generación de ratones quiméricos. La casilla en rojo representa los datos totales de las 4 sesiones realizadas. Se puede apreciar la eficiencia en la obtención de ratones quiméricos mediante inyección del clon ES 25 en blastocistos B6 albinos, que se sitúa en un 21% (6 ratones quiméricos en un total de 28 crías nacidas). De los 6 ratones quiméricos 3 resultaron ser machos (9114, 9115 y 9116) y 3 hembras (9117, 9118 y 9119) con diferentes grados de quimerismo. Se observa que sólo existe transmisión de la pigmentación a la línea germinal (procedente de la célula ES 25) en 2 de los 6 ratones obtenidos (9114 y 9116). Un 50% de la F1 obtenidas de estas 2 quimeras habían incorporado la secuencia completa del YAC, por lo tanto, siguiendo el patrón de herencia Mendeliano esperado. H, Hembra; M, macho; TG, transgénico; PG, pigmentado; B6 albino, [B6(Cg)-Tyr^{c-2J}/J]; (%) resultados del "test ji-cuadrado" obtenidos de "Mendel" Excel workbook (Montoliu, 2012) (ver ANEXO 2).

4.4.1.2.4 Identificación de ratones quiméricos APPwt

Como ya se mencionó en el punto anterior, las células ES portadoras del transgén proceden de una cepa de ratón de diferente color de pelaje a la cepa donadora de blastocistos, por lo que los ratones quiméricos obtenidos son fácilmente identificables debido a la variegación de su pelaje. De esta forma, se obtuvo un total de 28 ratones, de los cuales 6 ratones quiméricos (21%) con diferentes grados de quimerismo (desde un 10% a un 60%) (**Tabla R.4**). 3 resultaron ser machos (9114, 9115 y 9116) y 3 hembras (9117, 9118 y 9119) (**Figura R.46**). Se realizó adicionalmente una PCR del exón 6 del gen *APP* en estos ratones quiméricos para comprobar que contenían el YAC integrado en el genoma, siendo todos positivos para dicha PCR.

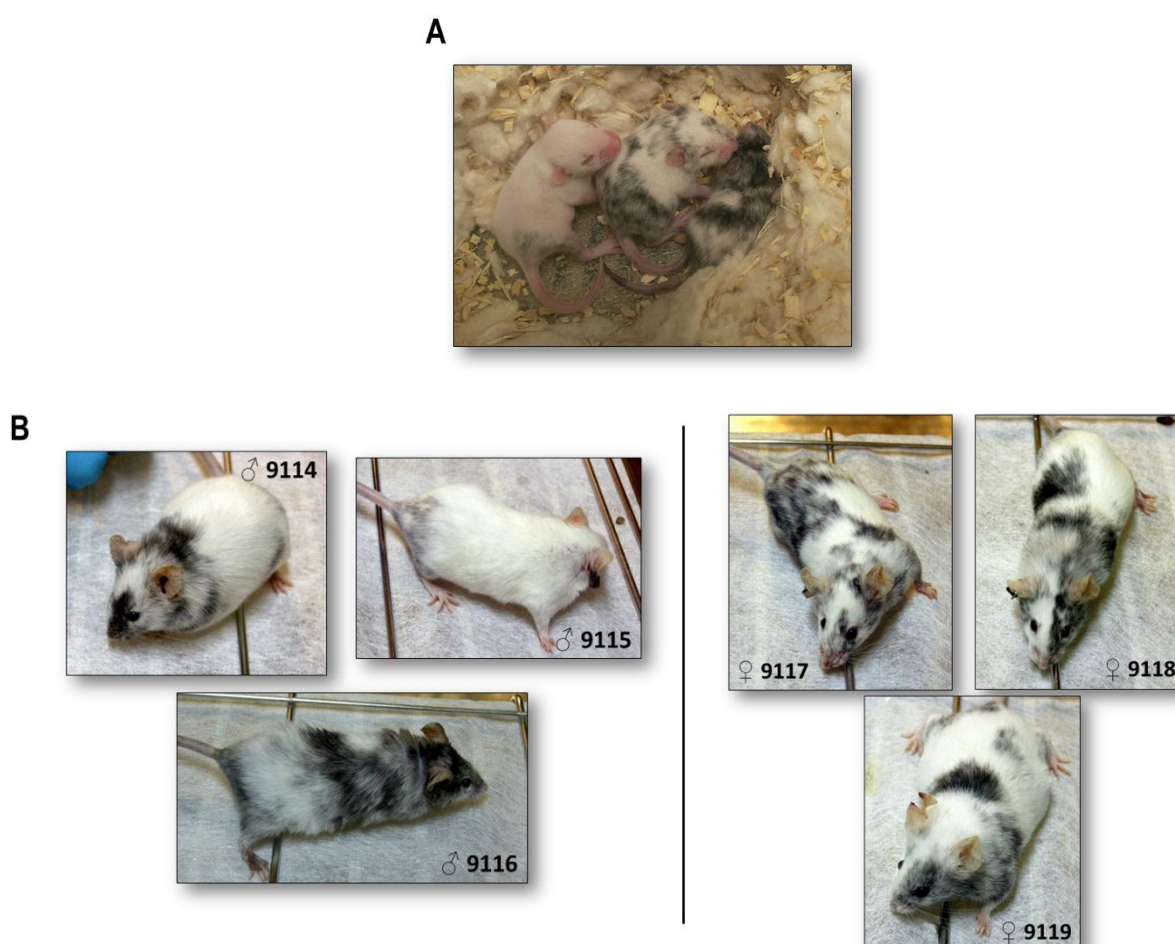


Figura R.46. Ratones quiméricos obtenidos a partir del clon de células ES 25, portador del YAC APPwt. (A) Identificación de ratones quiméricos. Ratones de una semana de edad. Se puede apreciar la variegación en su pelaje y el diferente grado de quimerismo de cada uno. De izquierda a derecha: 9115, 9117 y 9116. (B) Ratones adultos de tres meses de edad. A la izquierda los 3 machos obtenidos (9114, 9115 y 9116) y a la derecha las 3 hembras (9117, 9118 y 9119).

4.4.1.2.5 Transmisión del YAC APPwt a la línea germinal en ratones quiméricos

Las células ES *Bruce4* utilizadas son células derivadas de un ratón macho (Köntgen & Stewart, 1993; Hughes et al., 2007) y por lo tanto, si existe una contribución importante de estas células ES en la línea germinal puede provocar que, tras la inyección de estas células a un blastocisto, con independencia del sexo de éste, se convierta en una quimera fenotípicamente masculina. Sin embargo, en ocasiones pueden existir ratones hembra capaces de portar el transgén en la línea germinal debido a que, durante el cultivo de las células ES, se haya producido la pérdida del cromosoma Y, siendo genéticamente XO, y produciendo un fenotipo hembra (Frendewey et al., 2010) similar a lo que acontece en humanos en el denominado Síndrome de Turner. Es por esa razón que se decidió cruzar tanto los 3 machos como las 3 hembras obtenidas con ratones de una cepa albina (NMRI). La obtención de descendencia pigmentada tras este cruce pondría de manifiesto la correcta colonización de la línea germinal por parte de las células ES provenientes del clon 25, y por tanto la obtención de una nueva línea transgénica. Tras esta serie de cruces se observó que los ratones machos 9114 y 9116 eran capaces de producir descendencia pigmentada. En el caso del ratón 9114 (que se estimaba una contribución del genotipo de las células ES 25 aproximadamente del 30%) se obtuvieron 23 descendientes pigmentados de 24 descendientes totales (95.8%) y en el caso del ratón 9116 (con una contribución aproximadamente del 60%) se obtuvieron 13 descendientes pigmentados de 14 descendientes totales (92.9%). El ratón macho 9115 (que se estimaba una contribución aproximadamente del 10%) tuvo un total de 28 descendientes, todos albinos; la hembra 9117 tuvo un total de 22 descendientes, todos albinos; la hembra 9118 tuvo un total de 16 descendientes, todos albinos y la hembra 9119 tuvo un total de 13 descendientes, todos albinos. Por lo tanto solamente se obtuvo transmisión por vía germinal a partir de las quimeras 9114 y 9116 (**Tabla R.4**).

Además, para comprobar la transmisión del YAC APPwt, que debería encontrarse en hemigiosis, se realizaron primero tres PCRs a los descendientes pigmentados obtenidos: se procedió a analizar la presencia de los dos brazos del YAC mediante dos PCRs (*lys2* y *trp1*), y una PCR del exón 6 del gen *APP*. Así, se analizaron los 36 ratones pigmentados (23 descendientes del ratón 9114 y 13 descendientes del ratón 9116) identificándose un total de 18 ratones (50%) portadores del YAC (10 descendientes transgénicos del ratón 9114 y 8 descendientes transgénicos del ratón 9116), lo que ponía de manifiesto el patrón de herencia Mendeliano esperado (50%) (Montoliu, 2012) entre la descendencia pigmentada (**Tabla R.4**).

Debido a que las células ES portadoras del transgén son células derivadas de ratones C57BL/6 (Köntgen & Stewart, 1993), aunque no puras (Hughes et al., 2007), una vez contrastada la

transmisión a la línea germinal mediante el cruce con una cepa albina, se procedió a retrocruzar los ratones quiméricos 9114 y 9116 con hembras C57BL/6JOlaHsd para la obtención de una línea pura congénica portadora del transgén en fondo genético C57BL/6J. Se obtuvieron un total de 38 descendientes para el ratón 9114, y 35 descendientes para el ratón 9116. De nuevo se identificaron los descendientes transgénicos obtenidos [generación filial 1 (F1)] mediante PCR, obteniendo 16 ratones transgénicos del ratón 9114, y 9 para el ratón 9116. Estableciéndose con estos ratones una nueva línea transgénica APP^{w^t} en fondo genético C57BL/6J, denominada Tg25 debido a que provenían del clon ES 25.

Para completar el estudio genómico de los ratones transgénicos F1 obtenidos, se decidió verificar la estructura del YAC APP^{w^t} mediante *Southern blot* comparativo de los descendientes de los dos ratones quiméricos, de la misma forma que se realizó para las líneas Tg2670 y Tg2673 (apartado 4.4.1.1.2.). En esta ocasión se digirió, con la enzima de restricción *Hind* III, el ADN genómico del clon W4c19 de levadura, del clon de célula ES 25 y los diferentes ADN genómicos de los ratones quiméricos 9114 y 9116 y un F1 de cada uno de ellos. Tras la electroforesis y transferencia a membrana, se hibridó con sondas *Alu* exclusivas del genoma humano. Se observó que el patrón de bandas obtenido para el clon W4c19, portador del YAC APP^{w^t}, era el mismo que se obtuvo para el clon de célula ES 25, para los dos ratones quiméricos (9114 y 9116) y para sus descendientes, lo cual sugería que no se habían producido grandes alteraciones o reordenaciones en el YAC integrado en el genoma de ratón.

4.4.1.2.6 Análisis de la expresión del gen APP humano en la línea Tg25

Una vez establecida la línea Tg25 portadora del YAC APP^{w^t}, era necesario caracterizar los niveles de expresión del gen APP humano a nivel de ARN y de proteína. Se utilizaron ratones correspondientes a la primera generación (F1), tanto ratones procedentes de la quimera 9114, como de la 9116, utilizando machos y hembras de dos a cuatro meses y comparándolos con hermanos de camada no transgénicos. Todos los análisis realizados para la línea Tg25 se llevaron a cabo del mismo modo que los descritos en las líneas Tg2670 y Tg2673 (apartado 4.4.1.1.3.).

En la **Figura R.47** se representan los niveles de expresión relativa del gen APP humano y del gen *App* murino en el cerebro, para un grupo de 5 ratones transgénicos de la línea Tg25 y 5 ratones hermanos de camada no transgénicos, obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa. Se puede observar que existe expresión del gen APP humano en los ratones transgénicos y ningún tipo de expresión en

los ratones silvestres, comprobando que existe una expresión del 69% del gen *APP* humano respecto al gen *App* murino para estos ratones transgénicos de la línea Tg25 (**Figura R.47** y **Tabla R.8**).

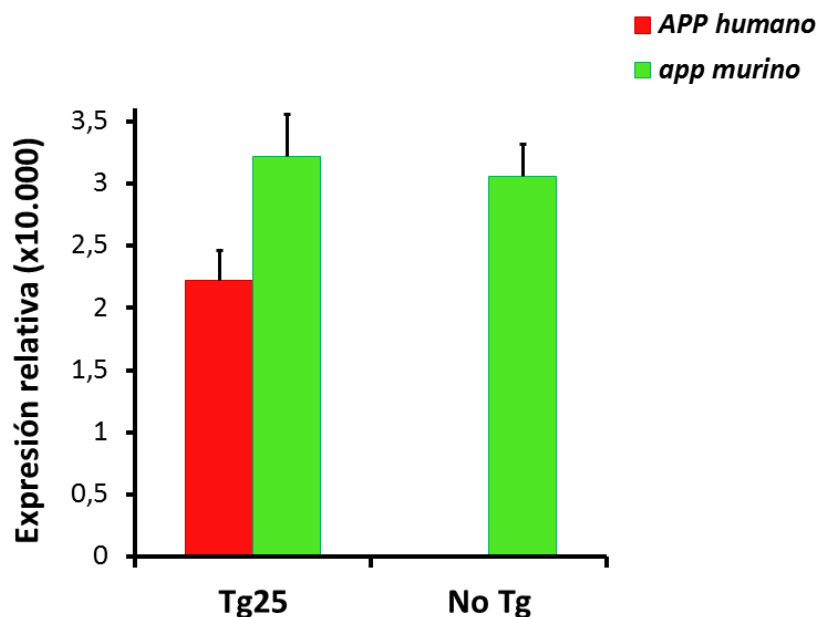


Figura R.47. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de *APP* humano (rojo) y *App* murino (verde) en cerebros de ratones transgénicos (Tg25). El grupo de ratones Tg25 está compuesto por 3 machos y 2 hembras (n=5) transgénicos de la primera generación filial (F1) de entre dos y cuatro meses de edad. El grupo de ratones no transgénicos (No Tg) son 5 hermanos de camada (n=5) de la línea Tg25. Se puede observar que existe expresión del gen *APP* humano en los ratones transgénicos de la línea Tg25, con niveles de expresión del 69% respecto al gen *App* murino. El eje Y representa los niveles de expresión relativa de ambos genes (multiplicado por 10.000) normalizados con el gen 18S. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar de dos experimentos realizados por triplicado.

Se decidió realizar un análisis de expresión del gen *APP* humano en las diferentes regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) de los ratones de la línea Tg25. Para ello, la mitad del cerebro del ratón se diseccionó en cuatro partes que se denominaron de forma arbitraria: mesencéfalo, corteza, diencéfalo y cerebelo (**Figura MM.1**) y se analizaron junto a la médula espinal. Se observó que existía expresión del gen *APP* humano en las diferentes regiones, mostrando mayores niveles de expresión del gen *APP* humano y del gen *App* murino en la corteza y los menores en mesencéfalo (**Figura R.48**). Además, las relaciones entre expresión del gen *APP* humano y del gen *App* murino eran proporcionales en cada región (**Figura R.48**) y similares a los observados en cerebro (**Figura R.47**).

Para finalizar los análisis de expresión se decidió comparar la expresión del gen *APP* humano en los diferentes órganos extraídos de ratones de la línea Tg25: cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, bazo, riñón, hígado y testículo. Los resultados, que se muestran en la **Figura R.49**, denotan el mayor nivel de expresión del gen en el cerebro, demuestra expresión moderada en órganos como

pulmón, riñón y testículo, mientras que en tejidos como corazón, estómago, intestino, bazo e hígado los niveles son más bajos y con una variabilidad más importante.

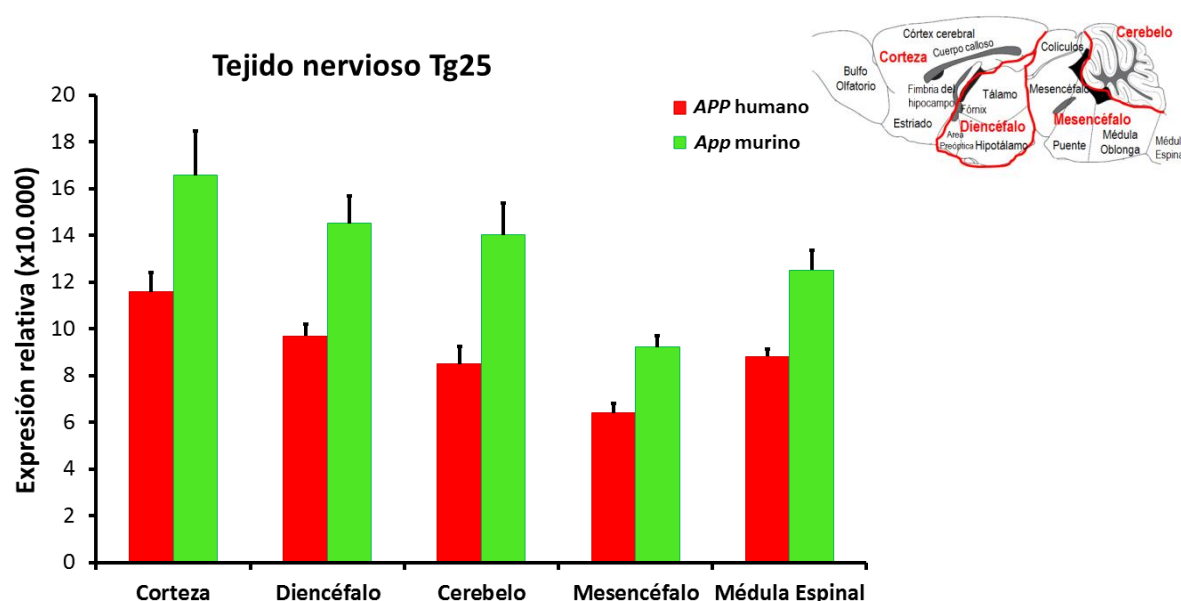


Figura R.48. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de *APP* humano (rojo) y *App* murino (verde) en el SNC (Tg25). El grupo de ratones está compuesto por 3 machos (n=3) transgénicos de la primera generación filial (F1) de entre dos y cuatro meses de edad. Se puede observar que existe expresión del gen *APP* humano en las diferentes regiones analizadas de la línea Tg25 y se mantiene la proporcionalidad con el gen *App* murino. El eje Y representa los niveles de expresión relativa de ambos genes (multiplicado por 10.000) normalizados con el gen 18S. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar de dos experimentos realizados por triplicado.

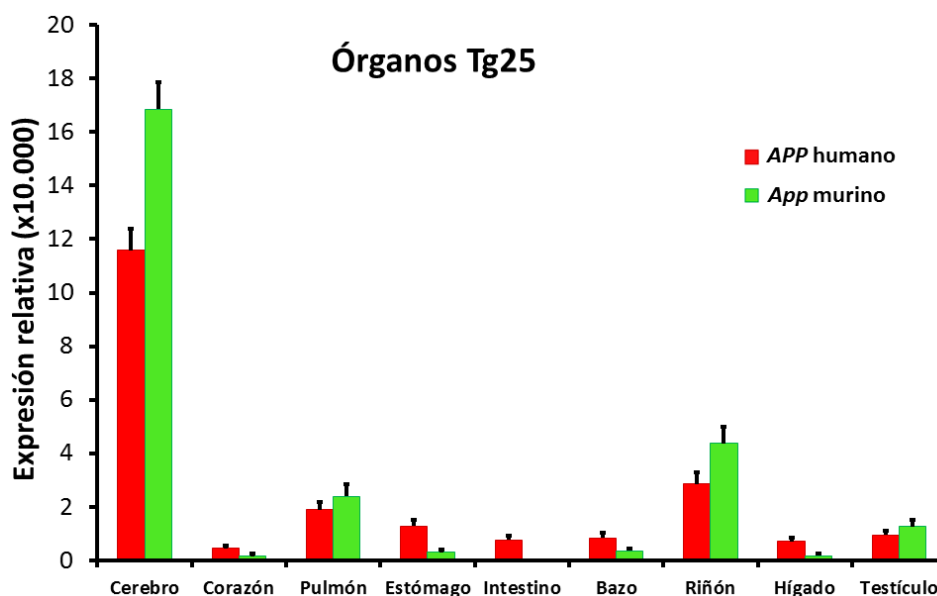


Figura R.49. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de *APP* humano (rojo) y *App* murino (verde) en diferentes órganos (Tg25). El grupo de ratones está compuesto por 3 machos (n=3) transgénicos de la primera generación filial (F1) de entre dos y cuatro meses de edad. Se puede observar que existe expresión del gen *APP* humano en los diferentes órganos analizados de la línea Tg25 y aquellos órganos que muestran mayor expresión del gen *APP* humano (cerebro, pulmón, riñón y testículo) coinciden con la mayor expresión del gen *App* murino. El eje Y representa los niveles de expresión relativa de ambos genes (multiplicado por 10.000) normalizados con el gen 18S. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar de dos experimentos realizados por triplicado.

A continuación, se procedió a un análisis de los tres transcritos mayoritarios, generados tras el mecanismo de *splicing* alternativo, tanto del *APP* humano (*APP*₇₇₀, *APP*₇₅₁ y *APP*₆₉₅) como del *App* murino (*App*₇₇₀, *App*₇₅₁ y *App*₆₉₅) en los diferentes tejidos de la línea de ratones transgénicos Tg25. Debido a que el YAC contiene el locus completo del gen *APP*, y por ende, sus regiones reguladoras y los diferentes intrones del gen *APP*, el patrón de *splicing* de *APP* tejido-dependiente debería mantenerse en los ratones. Esta técnica de análisis cualitativo consistió en el diseño de dos cebadores específicos de humano y dos específicos de ratón (apartado 3.2.5), de los cuales uno de cada especie se sitúa en el interior de la secuencia del exón 6 del gen y el otro en el interior de la secuencia del exón 9. Si está presente en la muestra el ARNm del transcrito 770, al ser el más largo para humano y para ratón (generada a partir de los 18 exones), debería ser capaz de generar, con los cebadores descritos, un producto de PCR de 436 pb para el humano y de 440 pb para el ratón al amplificar la región correspondiente a los exones 6, 7, 8 y 9. Si esta presente el ARNm del transcrito 751 se podría generar un producto de PCR de 379 pb para el humano y de 383 pb para el ratón al amplificar la región correspondiente a los exones 6, 7 y 9 ya que mediante *splicing* excluye el exón 8; y si esta presente el ARNm del transcrito 695 se podría generar un producto de PCR de 211 pb para el humano y de 215 pb para el ratón al amplificar la región correspondiente a los exones 6 y 9 ya que mediante *splicing* excluye el exón 8 y el exón 7 (**Figura R.50A**). Para realizar este análisis se utilizó el ARNm extraído, mediante RT-PCR se obtuvo el ADNc de los diferentes tejidos, tanto de un ratón transgénico de la línea Tg25 como un ratón no transgénico (*wt*); y finalmente se realizó una PCR convencional utilizando de molde este ADNc. Así, analizando primero el SNC (**Figura R.50B**) y a continuación los diferentes órganos (**Figura R.50C**), se pudo observar que en tejido nervioso del ratón transgénico, el transcrito mayoritario de *APP* humano era el 695 como ya había sido descrito (Tanaka et al., 1989), observando ciertos niveles del 751. Sin embargo, el estudio de transcritos en ratón reveló que en tejido nervioso prácticamente era detectable únicamente el 695, encontrando cierta similitud con estudios previos realizados sobre tejido nervioso de humano y de ratón (Rockenstein et al., 1995), en donde la relación entre los tres ARNm en la corteza frontal humana es la siguiente: 770:751:695; 5:37:58 (% del total), mientras que en cerebro de ratón la proporción es muy distinta y corresponde a: 770:751:695, 3:3:94 (% del total). En el estudio realizado en los diferentes órganos (**Figura R.50C**) se pudo observar que también existía expresión del gen *APP* humano y que el transcrito humano mayoritario era dependiente del órgano a analizar, corroborando el patrón de *splicing* de *APP* tejido-dependiente. Se observó que en órganos como cerebro y testículo el transcrito mayoritario era el 695 mientras que órganos como corazón, pulmón, riñón e hígado se encontraban el 770 y 751 mayoritariamente. Al analizar los transcritos murinos se pudo apreciar un patrón similar al humano, con la diferencia de que en cerebro prácticamente se identificaba sólo el transcrito 695; en hígado,

riñón y pulmón, además de los transcritos 770 y 751 también se identificaba el 695; en intestino se identificaba el transcrito 770 y en bazo el 751.

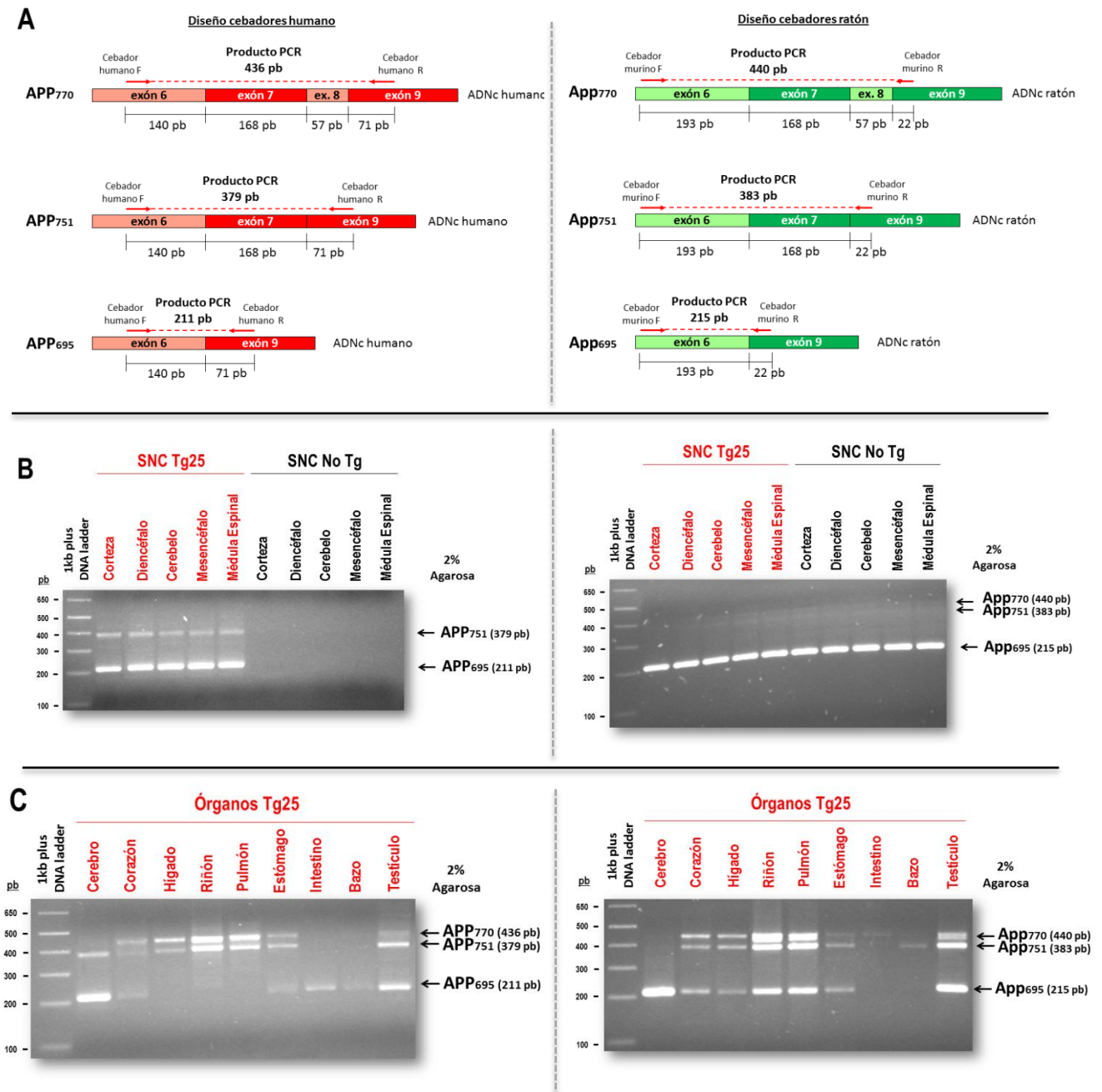


Figura R.50. Análisis de los tres transcritos principales del APP humano y del App murino en diferentes tejidos de ratones transgénicos de la línea Tg25. (A) Diseño de los cebadores para la discriminación entre los tres transcritos 770, 751 y 695 del APP humano (izquierda) y del App murino (derecha). (B) Análisis del SNC de ratones transgénicos Tg25 y ratones wt (No Tg). A la izquierda se puede apreciar la PCR usando cebadores específicos de humano. En los ratones transgénicos se puede observar un producto de PCR, observándose que en tejido nervioso el transcrito mayoritario es APP₆₉₅ y detectando el transcrito APP₇₅₁ en menor medida. En los ratones wt no se produce ningún producto de PCR. A la derecha se puede apreciar la PCR usando cebadores específicos de ratón. Tanto en los ratones transgénicos como en los wt se puede apreciar un producto de PCR, observándose que en tejido nervioso el transcrito mayoritario es APP₆₉₅. (C) Análisis de diferentes órganos de ratones transgénicos Tg25. A la izquierda se puede apreciar la PCR usando cebadores específicos de humano y se podría concluir que el patrón de *splicing* es tejido-dependiente. A la derecha se puede apreciar la PCR usando cebadores específicos de ratón y como el patrón de *splicing* es ligeramente diferente al observado en el análisis de transcritos humanos.

El siguiente paso consistió en detectar la presencia de proteína APP humana en los cerebros de ratones transgénicos Tg25 mediante *western blot* y usando de nuevo el anticuerpo monoclonal 6E10, que reconoce únicamente la proteína APP humana. En la **Figura R.51** se puede observar un *western blot* representativo de la línea Tg25. Como se puede apreciar, en esta ocasión, los ratones de la línea Tg25 mostraron niveles de proteína APP humana detectables mediante dicha técnica.

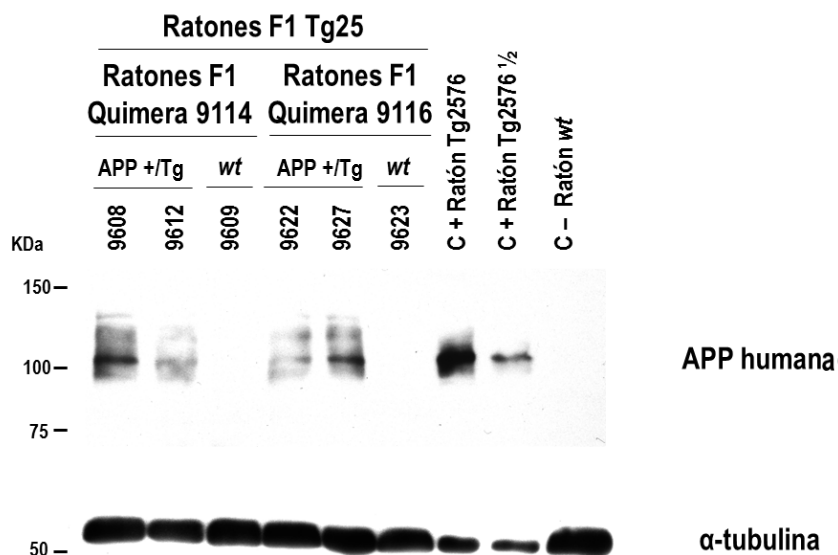


Figura R.51. Detección de proteína APP humana (anticuerpo 6E10) mediante *western blot* en cerebros de ratones transgénicos (Tg25). El grupo de ratones Tg25 está compuesto por 4 ratones transgénicos (APP +/Tg) provenientes de la quimera 9114 (1 macho y 1 hembra) y de la quimera 9116 (1 macho y 1 hembra) y 2 hermanos de camada no transgénicos (wt) de la primera generación filial (F1), de dos y tres meses de edad. Se analizaron 50 µg de proteínas totales extraídas de homogeneizado de cerebro de ratón, excepto para el control positivo que se analizaron 15 µg y 7.5 µg ($\frac{1}{2}$). Como se puede apreciar, los ratones transgénicos de la línea Tg25 muestran niveles de proteína detectables por *western blot*. Se muestra un *western blot* de α -tubulina como control de carga de proteína. C+ Ratón Tg2576 – Control positivo, ratón comercial capaz de sobreexpresar 5.5 veces el gen APP humano respecto al murino. C – ratón wt – Ratón silvestre C57BL/6J.

Adicionalmente, para completar el análisis de la proteína APP humana, se realizó *western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal 22c11. Debido a que este anticuerpo es capaz de reconocer el extremo amino terminal tanto de la proteína APP humana como de la proteína App murina, en los ratones no transgénicos (wt), que no expresan APP humano, los valores totales obtenidos mediante densitometría, son considerados exclusivamente proteína App murina. Sin embargo, en el caso de los ratones transgénicos Tg25, la diferencia entre los valores totales obtenidos mediante densitometría y los valores totales de los ratones wt, son considerados proteína APP humana. De esta forma se pudo comparar el nivel de proteína APP humana respecto al nivel de proteína App murina en cerebro de ratones transgénicos de la línea Tg25. En la **Figura R.52** se puede observar un *western blot* representativo con el anticuerpo 22c11 para los ratones transgénicos de la Tg25 y de los hermanos de camada no transgénicos (wt) y la valoración de la expresión, normalizada con α -tubulina, se muestra en la gráfica inferior. Mediante este análisis densitométrico, se pudo observar que hay un 43% de

proteína APP humana respecto a proteína App murina en el cerebro de la línea Tg25 (**Figura R.52 y Tabla R.8**).

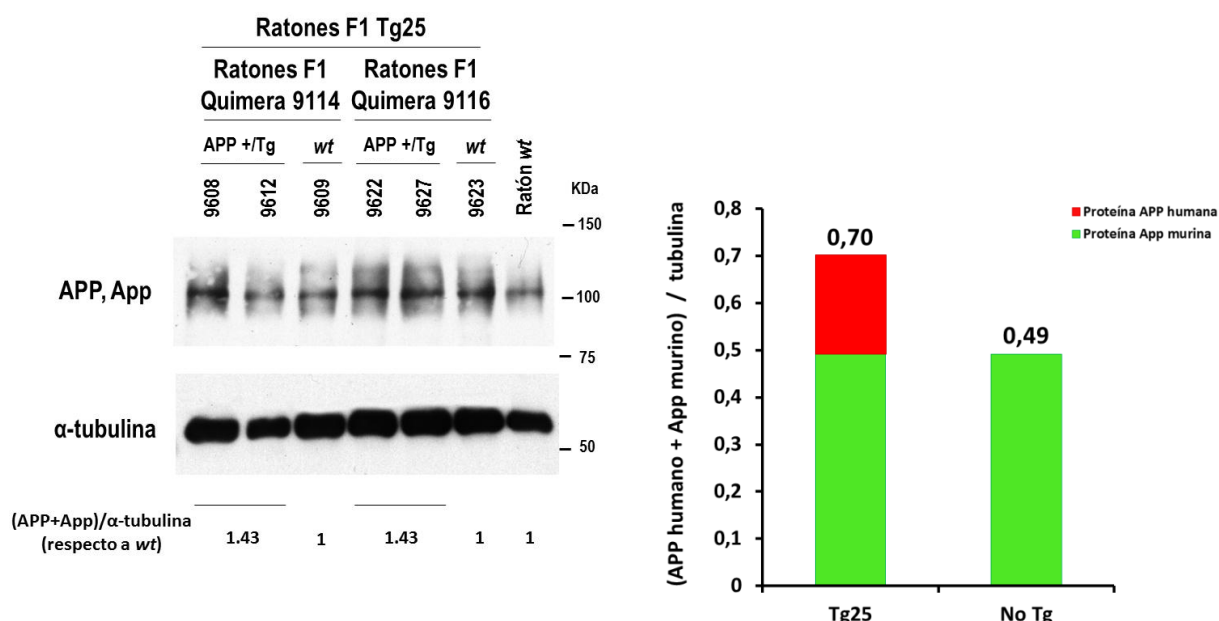


Figura R.52. Detección de los niveles de proteína APP humana y App murina (anticuerpo 22c11) mediante *western blot* en cerebros de ratones transgénicos (Tg25). A la izquierda *western blot* representativo. El grupo de ratones Tg25 está compuesto por 4 ratones transgénicos (APP +/Tg) provenientes de la quimera 9114 (1 macho y 1 hembra) y de la quimera 9116 (1 macho y 1 hembra) y 2 hermanos de camada no transgénicos (wt) de la primera generación filial (F1), de dos y tres meses de edad. Se analizaron 50 μ g de proteínas totales extraídas de homogeneizado de cerebro de ratón. Se utilizó el anticuerpo 22c11 para detectar los niveles de proteína APP humana y App murina. Se muestra un *western blot* de α -tubulina como control de carga de proteína. Los valores numéricos bajo el *western blot* representan los niveles de proteína APP humana y App murina normalizados por α -tubulina de la línea Tg25 respecto a los ratones wt (sólo proteína App murina). Ratón wt – Ratón silvestre C57BL/6J. A la derecha se representa, a partir de los datos densitométricos, los niveles de proteína APP humana (rojo) y App murina (verde) normalizados con α -tubulina. Los números encima de las columnas representan los valores densitométricos.

4.4.1.2.7 Nomenclatura oficial del ratón transgénico Tg25

De acuerdo a las recomendaciones del Comité Internacional para la Nomenclatura genética estandarizada de ratones (<http://jaxmice.jax.org/support/nomenclature/index.html>) (Montoliu & Whitelaw, 2011) el ratón transgénico Tg25 generado tiene la siguiente nomenclatura oficial:

B6-Tg(APP)25Sgo

4.4.2 GENERACIÓN DEL RATÓN APP^{swe}

4.4.2.1 Microinyección del YAC APP^{swe} en el pronúcleo de oocitos fecundados

La generación del ratón transgénico APP^{swe} se realizó también mediante microinyección en oocitos fecundados, utilizando para ello el YAC APP^{swe} purificado a una concentración de 0.5-1 ng/μl y realizando diferentes sesiones de microinyección (**Tabla R.5**). De nuevo se utilizaron ratones B6CBAF1 como donante de oocitos fecundados, por lo tanto, estos oocitos microinyectados son B6CBAF2.

La **Tabla R.5** es una tabla resumen en la que se muestran los datos correspondientes a las doce sesiones de microinyección del YAC APP^{swe}, así como los ratones transgénicos obtenidos.

Ratones donadores de oocitos	YAC	Tamaño (kb)	Hembras superovuladas (SD)	Hembras con tapón vaginal (% SD)	Oocitos fecundados obtenidos (oocitos/hembra con tapón vaginal)	Oocitos fecundados microinyectados (% recuperados)	Embriones transferidos (% microinyectados)	Hembras pseudogestantes utilizadas (embriones/hembra)	Hembras gestantes y a término (% pseudogestantes)	Crias nacidas (% embriones transferidos)	Transgénicos identificados (% crías)	Transgénicos con el YAC intacto (% crías transgénicas)
B6CBAF1/OlaHsd	APP ^{swe}	565	6	6 (100)	150 (25)	118 (79)	66 (56)	3 (22)	2 (67)	4 (6)	0 (0)	-
			6	3 (50)	128 (43)	41 (32)	30 (75)	1 (30)	0 (0)	-	-	-
			6	3 (50)	36 (12)	0 (0)	-	-	-	-	-	-
			6	2 (33)	185 (92)	44 (24)	39 (89)	2 (19)	2 (100)	10 (26)	0 (0)	-
			6	4 (67)	119 (30)	92 (77)	78 (85)	3 (26)	3 (100)	12 (15)	0 (0)	-
			6	2 (33)	220 (110)	34 (15)	25 (74)	1 (25)	0 (0)	-	-	-
			6	4 (67)	140 (35)	79 (56)	62 (78)	3 (21)	0 (0)	-	-	-
			6	4 (67)	146 (36)	87 (60)	67 (77)	3 (22)	3 (100)	14 (21)	0 (0)	-
			6	6 (100)	270 (45)	115 (43)	80 (70)	4 (20)	0 (0)	-	-	-
			5	2 (33)	229 (114)	105 (46)	81 (77)	5 (16)	5 (100)	23 (28)	7 (30)	2 (29)
			5	4 (67)	122 (30)	87 (71)	70 (80)	3 (23)	3 (100)	8 (11)	2 (25)	1 (50)
			5	4 (67)	148 (37)	93 (63)	84 (90)	4 (21)	4 (100)	24 (29)	1 (4)	0 (0)
B6CBAF1/OlaHsd	APP ^{swe}	565	69	44 (64)	1893 (43)	895 (47)	682 (76)	32 (21)	21 (66)	95 (14)	10 (11)	3 (30)

Tabla R.5. Datos de las diferentes sesiones de microinyección del YAC APP^{swe}. La casilla en rojo representa los datos totales de las 12 sesiones realizadas. Se puede apreciar la eficiencia de transgénesis mediante microinyección para el YAC APP^{swe}, que se sitúa en un 11% (10 ratones transgénicos en un total de 95 crías nacidas). Un 30% de los ratones transgénicos habían incorporado la secuencia completa del YAC (ver ANEXO 3).

4.4.2.1.1 Identificación y análisis de ratones transgénicos fundadores APP^{swe}

La detección de los ratones transgénicos tras el proceso de microinyección se realizó mediante PCR, analizando la presencia de los dos brazos del cromosoma mediante una PCR doble (*lys2* y *leu2*) y la presencia del exón 6 del gen *APP* mediante otra PCR. Se analizaron los 95 ratones obtenidos tras la microinyección, obteniéndose bandas de PCR positivas en 10 ratones (3755, 3758, 3761, 3763, 3764, 3765, 3771, 3855, 3860 y 3889) (**Figura R.53**), lo que sugiere que han integrado total o parcialmente el YAC.

Para comprobar si la integración de este YAC ha sucedido de forma total o parcial en estos 10 ratones, se decidió realizar las veintiocho PCRs diseñadas a lo largo de todo el YAC, observando la integración total de éste en 2 de los 10 ratones transgénicos (3763 y 3860), y prácticamente total (falta

uno de los brazos) en el 3755; constituyéndose así los 3 ratones transgénicos fundadores (F0) con el YAC APP^{swe}. (Tabla R.6)

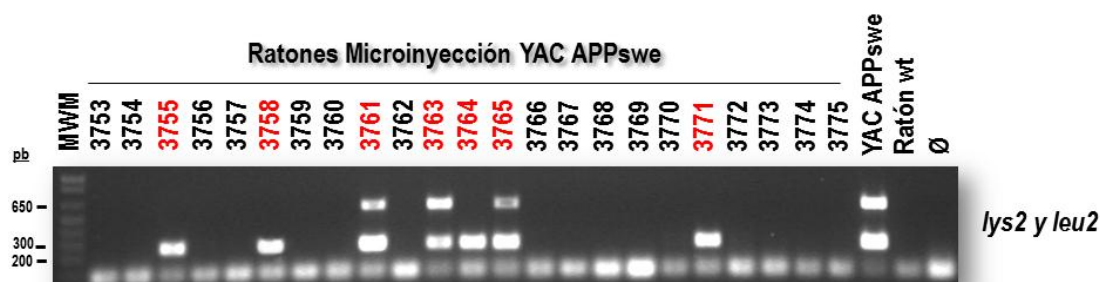


Figura R.53. Identificación mediante PCR de ratones transgénicos APP^{swe}. Se muestra, a modo de ejemplo, la PCR realizada a 23 ratones obtenidos en una sola sesión de microinyección. Se trata de una PCR doble diseñada para amplificar el gen *lys2* (592 pb) presente en un brazo del YAC, y el gen *leu2* (252 pb) en el otro brazo. Se puede observar que, de los 23 ratones analizados, 7 ratones (en rojo) fueron positivos para alguna de las PCRs. De éstos, 4 ratones salen positivos únicamente para el brazo de Leu (3755, 3758, 3764 y 3771) y 3 para ambos brazos (3761, 3763, 3765). De la misma forma se analizaron el resto de ratones obtenidos mediante microinyección, siendo finalmente positivos para alguna de las PCRs, además de los 7 mencionados, los ratones 3855, 3860 y 3889 (No se muestra la foto para estos últimos). MWM – marcador de peso molecular; YAC APP^{swe} – Solución de ADN de YAC APP^{swe} purificado. Ratón wt – Ratón silvestre. Ø – control sin ADN.

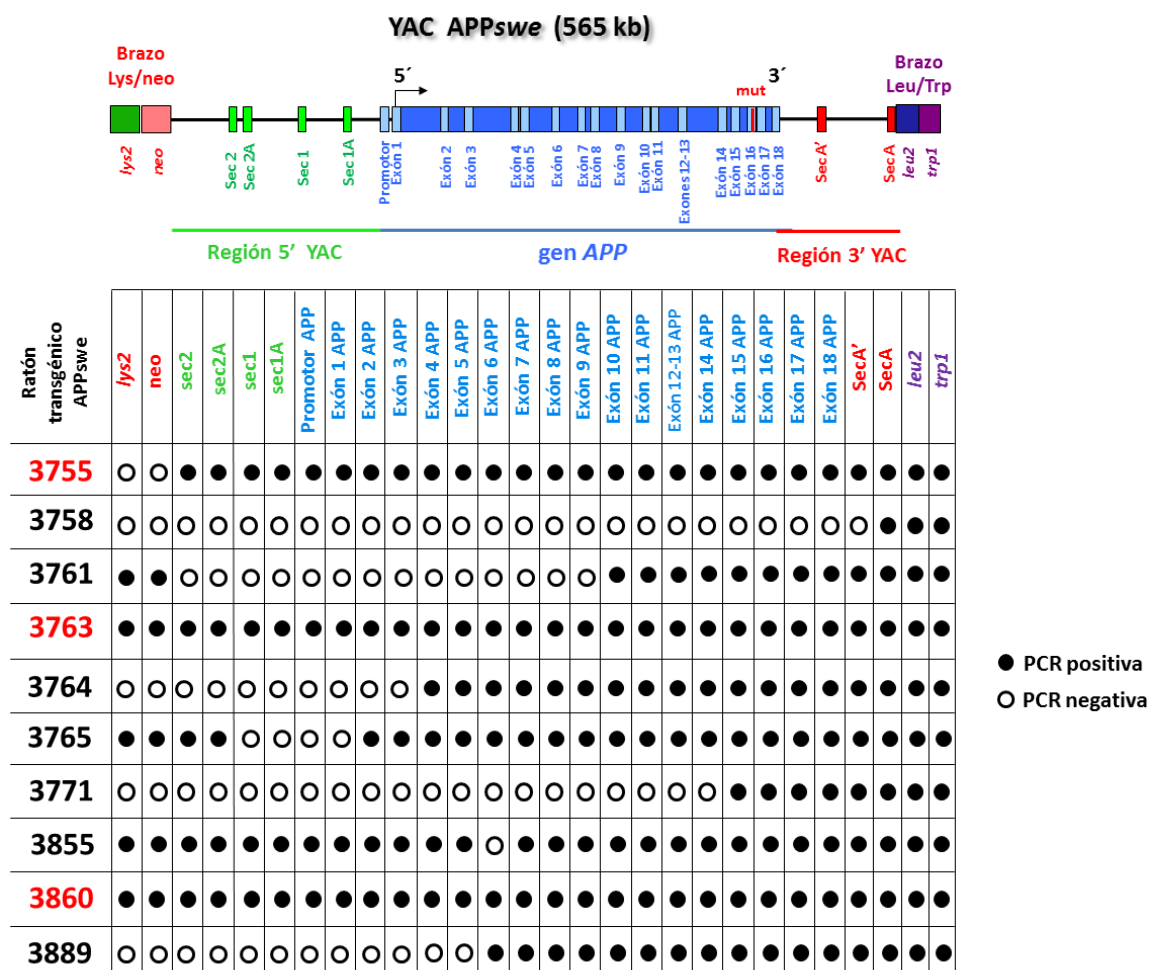


Tabla R.6. PCR de los 10 ratones transgénicos APP^{swe}. El punto negro indica presencia y el punto sin relleno ausencia de la secuencia analizada mediante PCR. Se puede observar que de los 10 ratones transgénicos obtenidos, 8 son ratones transgénicos parciales ya que no presentan la estructura completa del YAC, mientras que el 3763 y 3860 sí presentan la estructura completa. Además de estos 2 ratones, el ratón 3755 presenta prácticamente la totalidad del YAC (ausencia del brazo *Lys/neo*) considerándose igualmente un ratón con la incorporación total del YAC. De esto modo se constituyeron los 3 ratones fundadores (F0) (marcados en rojo) de las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860. Arriba se muestra un esquema del YAC APP^{swe} donde aparecen representados los lugares aproximados de estas PCRs analíticas.

Debido a que se habían generado estos ratones con el YAC APP^{swe}, se decidió comprobar el exón 16 del gen *APP* humano en dichos ratones para ver si presentaban la mutación “Sueca” integrada en el YAC utilizado como transgén. Para ello, al igual que en el estudio de los clones *Pop-out* de levadura (apartado 4.2.4.4.1), se realizó una PCR del exón 16 (507 pb) para los tres ratones transgénicos 3755, 3763 y 3860 generados con el YAC APP^{swe} y para los ratones transgénicos 2670 y 2673 generados con el YAC APP^{wild}. Se purificó el producto de PCR del exón 16 de cada ratón y se digirió con la enzima de restricción *Mbo* II. El patrón de corte que se debería obtener para el producto del exón 16 del YAC APP^{wild} sería: 198, 177, 118 y 14 pb; y para el producto del exón 16 del YAC APP^{swe} sería: 375 (debido a que se pierde el corte), 118 y 14 pb (**Figura R.28**). Se cargaron los productos de esta digestión en un gel de agarosa horizontal *NuSieve® GTG®* de alta resolución al 3%. Tras la electroforesis, se observó que los tres ratones 3755, 3763 y 3860 eran portadores de la mutación y mostraban el patrón de corte esperado con dicha mutación al digerir con *Mbo* II, mientras que los ratones 2670 y 2673 contenían la secuencia silvestre tal y como se esperaba (**Figura R.54**). El estudio se completó con la secuenciación de estos productos de PCR del exón 16 del gen *APP* para los 3 ratones, confirmándose que tenían los dos nucleótidos esperados mutados, integrados en el genoma del ratón.

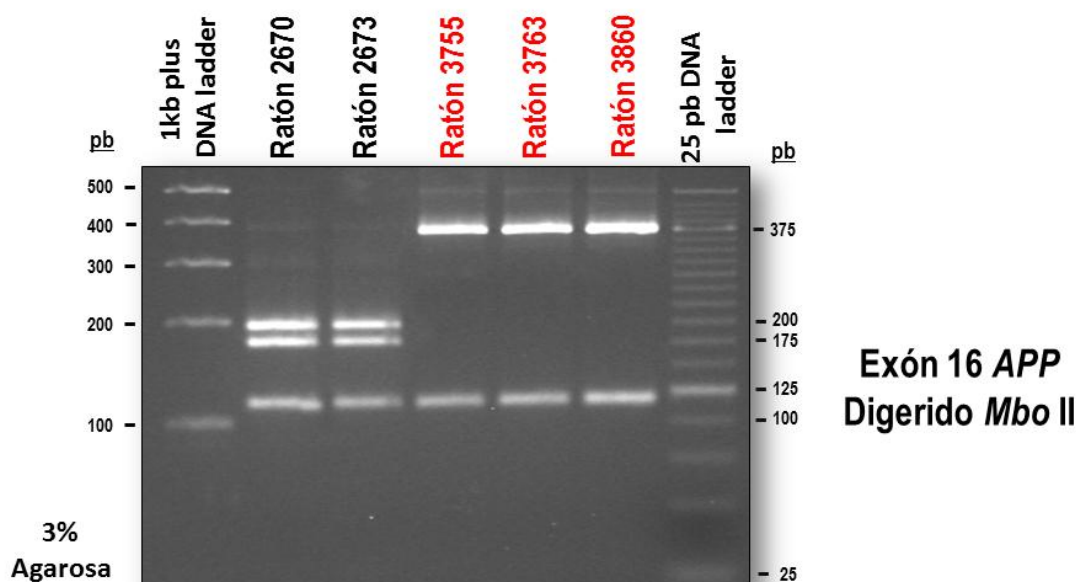


Figura R.54. Análisis del producto de PCR del exón 16 del gen *APP* de ratones APP^{swe}. Análisis mediante restricción enzimática con *Mbo* II. Se puede apreciar que los ratones 3755, 3763 y 3860 (en rojo) obtenidos mediante microinyección con el YAC APP^{swe}, contienen en su secuencia del exón 16 del gen *APP* la mutación “Sueca” debido a que han perdido una diana de corte para dicha enzima, obteniéndose el patrón esperado. Por el contrario, los ratones 2670 y 2673, obtenidos mediante microinyección con el YAC APP^{wild}, contienen el patrón de corte esperado para la secuencia silvestre (**Figura R.28**).

4.4.2.1.2 Transmisión del transgén YAC APP^{swe} a la descendencia (F1)

Una vez contrastada mediante PCR la generación de los 3 ratones transgénicos fundadores, el 3755, 3763 y 3860, se procedió a cruzarlos, al igual que los generados con el YAC APP^{wt}, con ratones C57BL/6JOlaHsd con el fin de comprobar la transmisión del transgén, que se encuentra en hemigiosis, a sus descendientes, evaluar su integridad estructural mediante cosegregación de todos los fragmentos analizados mediante PCR y analizar la expresión de dicho transgén en ellos.

Posteriormente, los ratones se retrocruzaron con ratones silvestres consanguíneos de fondo genético C57BL/6JOlaHsd para futuros estudios conductuales (Crawley, 2007).

Para este estudio de transmisión del YAC APP^{swe} se realizaron primero tres PCRs a los descendientes obtenidos [generación filial 1 (F1)]: se procedió a analizar la presencia de los dos brazos del YAC mediante dos PCRs (*lys2* y *leu2*), y una PCR del exón 6 del gen *APP*. Así, se analizaron 14 descendientes del ratón 3755, identificándose 4 ratones transgénicos, lo que implicaba una transmisión del 28.6%; en el caso del ratón 3763, se analizaron 24 descendientes, obteniendo 6 ratones transgénicos, lo que implica una transmisión del 25% y en el caso del ratón 3860, se analizaron 10 descendientes, obteniendo 7 ratones transgénicos, lo que implica una transmisión del 70%. Mediante los resultados del "test ji-cuadrado" obtenidos de "Mendel" Excel workbook (Montoliu, 2012) se obtuvo que el ratón 3755 y el ratón 3860 seguían un patrón de herencia Mendeliano, mientras que el 3763 presentaba mosaicismo (**Tabla R.7**).

YAC	Fondo genético de ratón	Línea transgénica	Sexo (H/M) y transmisión a la línea germinal (TG/crías F ₁)	Patrón Mendeliano o Mosaicismo (test ji-cuadrado) ^o
APP ^{swe}	B6CBAF2/OlaHsd	Tg3755	M: Sí (4/14)	Mendeliano
APP ^{swe}	B6CBAF2/OlaHsd	Tg3763	H: Sí (6/24)	Mosaicismo
APP ^{swe}	B6CBAF2/OlaHsd	Tg3860	H: Sí (7/10)	Mendeliano

Tabla R.7. Transmisión a la F1 del YAC APP^{swe} en las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860. H, Hembra; M, macho; TG, transgénico; (%) resultados del "test ji-cuadrado" obtenidos de "Mendel" Excel workbook (Montoliu, 2012).

A continuación, para comprobar que la estructura del YAC está intacta en los ratones F1 de las 3 líneas, se decidió realizar de nuevo las veintiocho PCRs analíticas diseñadas a lo largo de todo el YAC. Tras este análisis se observó que todos los ratones analizados eran positivos para todas las PCRs, lo cual indicaba la cosegregación de todos los fragmentos del YAC y sugería su integridad estructural, constituyéndose definitivamente las tres líneas transgénicas Tg3755, Tg3763 y Tg3860.

Para completar el estudio genómico de los ratones transgénicos F1 obtenidos tras el cruzamiento de sus fundadores, se decidió verificar la estructura del YAC APP^{swe} mediante *Southern blot* comparativo de los descendientes de los tres ratones fundadores, de la misma forma que se realizó para las líneas de ratones transgénicas con el YAC APP^{wt} (apartado 4.4.1.1.2). Se digirió, con la enzima de restricción *Hind* III, el ADN genómico del clon W4c19^{swe} de levadura y los diferentes ADN genómicos de los ratones F0 (3755, 3763 y 3860) y de un ratón de la F1 de cada uno de ellos. Tras la electroforesis y transferencia a membrana, se hibridó con sondas *Alu* exclusivas del genoma humano, obteniéndose el patrón de bandas para el YAC, que debería ser el mismo para todas las muestras analizadas si mantiene la estructura intacta (*FingerPrint*) (Jakobovits et al., 1993). Se observó que el patrón de bandas obtenido para el clon W4c19^{swe}, portador del YAC APP^{swe}, era el mismo que se obtuvo para los diferentes ratones fundadores (3755, 3763 y 3860) y para sus descendientes lo cual sugería que no se habían producido grandes alteraciones o reordenaciones en el YAC integrado en el genoma de ratón.

4.4.2.1.3 Análisis de la expresión del gen *APP* humano en las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860

Se analizaron los niveles de expresión del gen *APP* humano con la mutación “Sueca” en las líneas de ratones transgénicos Tg3755, Tg3763 y Tg3860, tanto a nivel de ARN como de proteína. Para este análisis se usaron ratones correspondientes a la segunda generación (F2) de las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860, utilizando machos y hembras de dos a cuatro meses de edad para cada una de las líneas, y comparándolos con hermanos de camada no transgénicos.

El primer paso para la comprobación de la correcta expresión del gen *APP* humano mutado en las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860, consistió en la constatación mediante RT-PCR de la transcripción del gen *APP* humano en el cerebro del ratón, realizando todo de la misma manera que en los análisis de ratones generados con el YAC APP^{wt} (apartado 4.4.1.1.3).

En la **Figura R.55** se representan los niveles de expresión relativa del gen *APP* humano mutado y del gen *App* murino en el cerebro, obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa, para un grupo de 5 ratones transgénicos de la línea Tg3755, 5 ratones transgénicos de la línea Tg3763, 5 ratones transgénicos de la línea Tg3860 y 6 ratones hermanos de camada no transgénicos (2 de cada una de las líneas). Se observó que, a nivel de ARNm, de las 3 líneas analizadas, las 3 eran capaces de expresar el gen *APP* humano mutado, obteniendo un nivel de expresión de 80% del gen *APP* humano

respecto al gen *App* murino en la línea Tg3755, de 0.4% para la línea Tg3763 y 158% para la línea Tg3860 (**Figura R.55** y **Tabla R.8**).

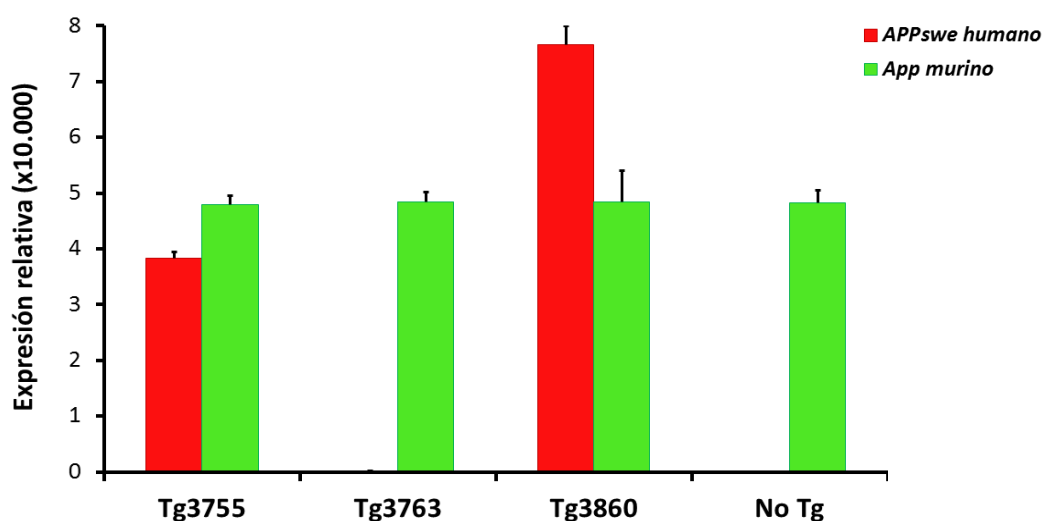


Figura R.55. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de *APP* humano con la mutación “Sueca” (rojo) y *App* murino (verde) en cerebros de ratones transgénicos (Tg3755, Tg3763 y Tg3860). El grupo de ratones Tg3755 está compuesto por 2 machos y 3 hembras (n=5) transgénicos de la segunda generación filial (F2) de dos meses de edad. El grupo de ratones Tg3763 está compuesto por 2 machos y 3 hembras (n=5) transgénicos, de la F2 de dos meses de edad. El grupo de ratones Tg3860 está compuesto por 2 machos y 3 hembras (n=5) transgénicos, de la F2 de tres meses de edad. El grupo de ratones no transgénicos (No Tg) son 6 hermanos de camada (n=6) de las tres líneas (1 macho y 1 hembra de cada uno). Se puede observar que existe expresión del gen *APP* humano en las tres líneas transgénicas, pero con niveles de expresión muy bajos comparados con los del gen *App* murino para la línea Tg3763. Con niveles de expresión ligeramente inferiores del gen *APP* humano respecto al gen *App* murino para la línea Tg3755 y con niveles superiores de expresión del gen *APP* humano respecto al gen *App* murino para la línea Tg3860. El eje Y representa los niveles de expresión relativa de ambos genes (multiplicado por 10.000) normalizados con el gen 18S. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado.

Se decidió realizar un análisis de expresión del gen *APP* humano en las diferentes regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) de los ratones de las líneas Tg3755 y Tg3860, que encontraban niveles de expresión del gen *APP* humano comparables al del gen *App* murino. Se realizó el ensayo de la misma forma que se hizo para la línea Tg25 (apartado 4.4.1.2.6). Se observó que existía expresión del gen *APP* humano en las diferentes regiones analizadas tanto de la línea Tg3755 (**Figura R.56A**) como de la línea Tg3860 (**Figura R.56B**), mostrando mayores niveles de expresión del gen *APP* humano y del gen *App* murino en la corteza y los menores en mesencéfalo (**Figura R.56**). Además, las relaciones entre expresión del gen *APP* humano y del gen *App* murino eran proporcionales en cada región (**Figura R.56**) y similares a los observados en cerebro para cada línea (**Figura R.55**).

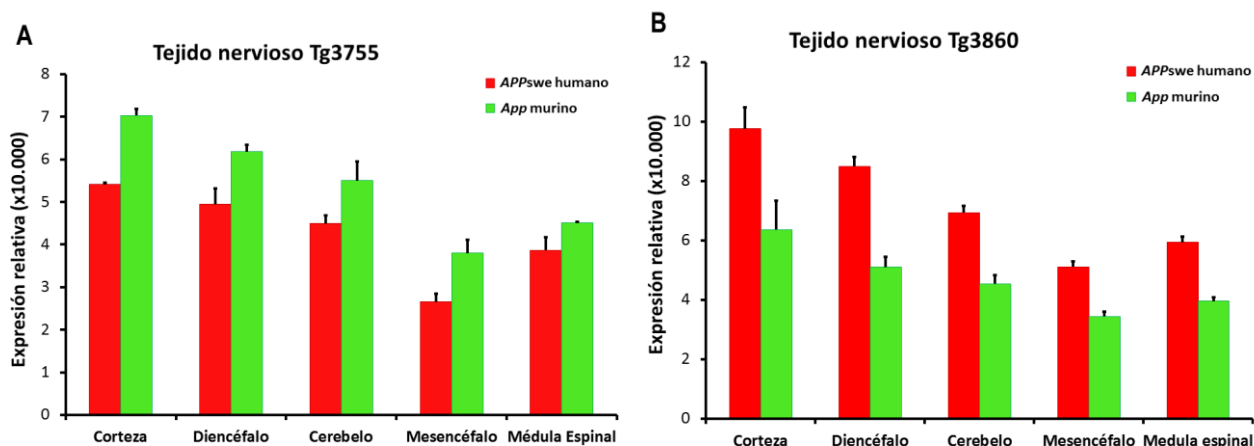


Figura R.56. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de *APP* humano (rojo) y *App* murino (verde) en el SNC (Tg3755 y Tg3860). (A) El grupo de ratones Tg3755 está compuesto por 2 machos (n=2) transgénicos de la segunda generación filial (F2) de dos meses de edad. (B) El grupo de ratones Tg3860 está compuesto por 2 machos (n=2) transgénicos, de la F2 de tres meses de edad. Se puede observar que existe expresión del gen *APP* humano mutado en las diferentes regiones analizadas para las dos líneas y se mantiene la proporcionalidad con el gen *App* murino. El eje Y representa los niveles de expresión relativa de ambos genes (multiplicado por 10.000) normalizados con el gen 18S. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar de dos experimentos realizados por triplicado.

Para finalizar los análisis de expresión se decidió comparar la expresión del gen *APP* humano con la mutación “Sueca” en los diferentes órganos extraídos de ratones de las líneas Tg3755 y Tg3860: cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, bazo, riñón, hígado y testículo. Los resultados, que se muestran en la **Figura R.57**, denotan el mayor nivel de expresión del gen en el cerebro, demuestra expresión moderada en órganos como pulmón, riñón y testículo, mientras que en tejidos como corazón, estómago, intestino, bazo e hígado los niveles son más bajos para las dos líneas.

A continuación, se procedió a un análisis de los tres transcritos mayoritarios, generados tras el mecanismo de *splicing* alternativo, tanto del *APP* humano (*APP*₇₇₀, *APP*₇₅₁ y *APP*₆₉₅) como del *App* murino (*App*₇₇₀, *App*₇₅₁ y *App*₆₉₅) en los diferentes tejidos de las dos líneas de ratones transgénicos Tg3755 y Tg3860. Todo el proceso se llevó a cabo del mismo modo que se realizó para la línea Tg25 (apartado 4.4.1.2.6) (**Figura R.50A**). Se pudo comprobar que en las dos líneas Tg3755 y Tg3860 se producía exactamente el mismo patrón de *splicing* que se había observado para la línea Tg25 en los diferentes tejidos (**Figura R.50**). Se observó que en órganos como cerebro y testículo la isoforma mayoritaria era la 695 mientras que órganos como corazón, pulmón, riñón e hígado se encontraban las isoformas 770 y 751 mayoritariamente.

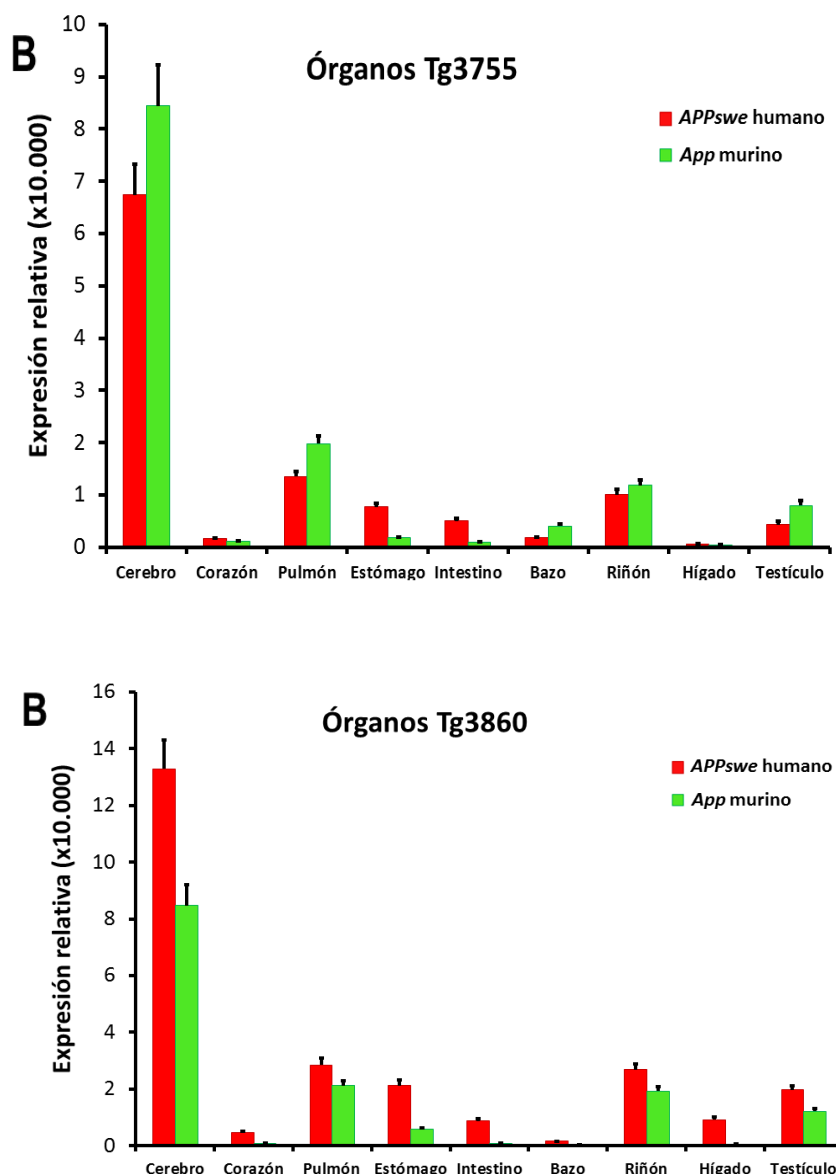
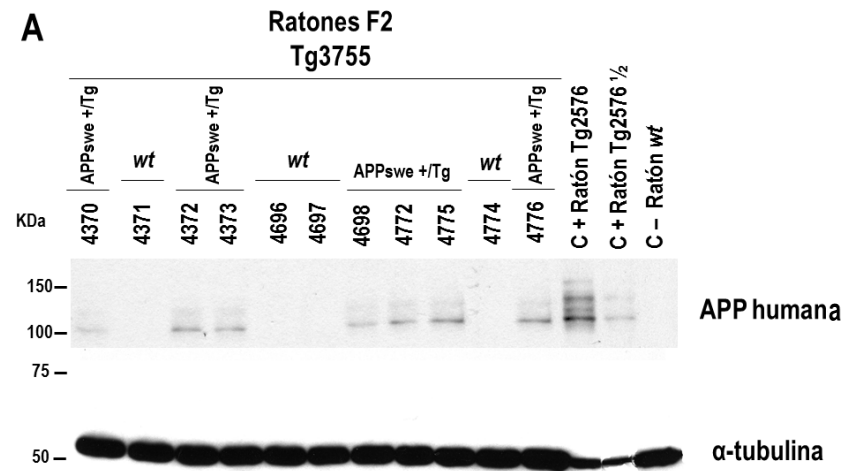


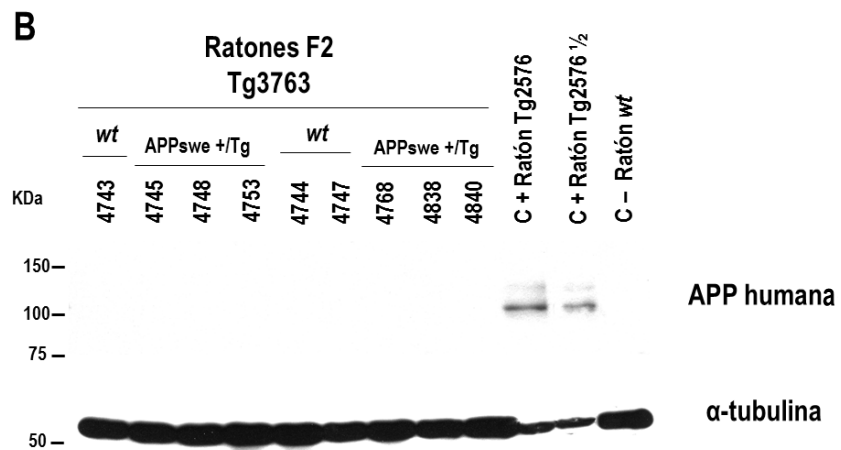
Figura R.57. Cuantificación relativa mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de APP humano (rojo) y App murino (verde) en diferentes órganos (Tg3755 y Tg3860). (A) El grupo de ratones Tg3755 está compuesto por 2 machos (n=2) transgénicos de la segunda generación filial (F2) de dos meses de edad. (B) El grupo de ratones Tg3860 está compuesto por 2 machos (n=2) transgénicos, de la F2 de tres meses de edad. Se puede observar que existe expresión del gen APP humano mutado en los diferentes órganos analizados tanto para la línea Tg3755 como para la línea Tg3860 y aquellos órganos que muestran mayor expresión del gen APP humano (cerebro, pulmón, riñón y testículo) coinciden con la mayor expresión del gen App murino. El eje Y representa los niveles de expresión relativa de ambos genes (multiplicado por 10.000) normalizados con el gen 18S. Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar de dos experimentos realizados por triplicado.

El siguiente paso consistió en detectar la presencia de proteína APP humana con la mutación “Sueca” en los cerebros de ratones transgénicos Tg3755, Tg3763 y Tg3860 mediante *western blot* y usando de nuevo el anticuerpo monoclonal 6E10, que reconoce únicamente la proteína APP humana, que en este caso es proteína APP con la mutación “Sueca”. En la **Figura R.58** se puede observar un *western blot* representativo para cada una de las tres líneas. Como se puede apreciar, y corroborando los resultados de expresión obtenidos mediante RT-PCR, los ratones de la línea Tg3860 muestran mayor cantidad de proteína APP humana mutada (**Figura R.58C**); niveles inferiores, pero detectables, para la línea Tg3755 (**Figura R.58A**) y niveles no detectables de proteína APP humana mutada para la línea Tg3763 (**Figura R.58B**).

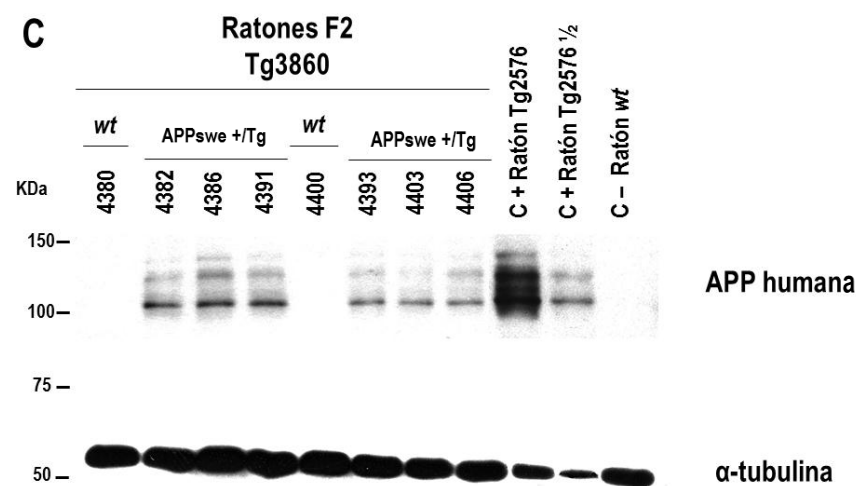
Figura R.58. Detección de proteína APP humana (anticuerpo 6E10) mediante *western blot* en cerebros de ratones transgénicos (Tg3755, Tg3763 y Tg3860). (A) El grupo de ratones Tg3755 está compuesto por 6 ratones transgénicos (APP^{swe} +/Tg) (4 machos y 2 hembras) y 4 hermanos de camada no transgénicos (wt) (3 machos y 1 hembra) de la segunda generación filial (F2), de dos y tres meses de edad.



(B) El grupo de ratones Tg3763 está compuesto por 6 ratones transgénicos (APP^{swe} +/Tg) (4 machos y 2 hembras) y 3 hermanos de camada no transgénicos (wt) (1 macho y 2 hembras) de la segunda generación filial (F2), de dos y tres meses de edad.



(C) El grupo de ratones Tg3860 está compuesto por 6 ratones transgénicos (APP^{swe} +/Tg) (3 machos y 3 hembras) y 2 hermanos de camada no transgénicos (wt) (1 macho y 1 hembra) de la segunda generación filial (F2), de dos y tres meses de edad. En todos los casos se analizaron 50 μ g de proteínas totales extraídas de homogeneizado de cerebro de ratón, excepto para el control positivo que se analizaron 15 μ g y 7.5 μ g ($\frac{1}{2}$). Como se puede apreciar, los ratones transgénicos de la línea Tg3755 y Tg3860 muestran niveles de proteína detectables por *western blot*, mientras que la línea Tg3763 no. Se muestra un *western blot* de α -tubulina como control de carga de proteína. C+ Ratón Tg2576 – Control positivo, ratón comercial capaz de sobreexpresar 5.5 veces el gen APP humano respecto al murino. C – ratón wt – Ratón silvestre C57BL/6J.



Para finalizar el análisis de la proteína APP humana, se realizó un nuevo *western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal 22c11, tal y como se realizó para los animales de la Tg25 (apartado 4.4.1.2.6). De esta forma se pudo comparar el nivel de proteína APP humana mutada respecto al nivel de proteína App murina en cerebro de ratones transgénicos de las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860. En la **Figura R.59** se puede observar un *western blot* representativo con el anticuerpo 22c11 para los ratones transgénicos de las 3 líneas y de los hermanos de camada no transgénicos (wt) y la valoración de la expresión, normalizada con α -tubulina, se muestra en la gráfica inferior. Así, mediante este análisis densitométrico, se vio que existía un 51% de proteína APP humana mutada respecto a proteína App murina en la línea Tg3755, que no existían niveles de proteína APP humana mutada para la línea Tg3763, tal y como se observó mediante el *western blot* anterior con el anticuerpo 6E10, y un 117% de proteína APP humana respecto a proteína App murina en la línea Tg3860 (**Figura R.59** y **Tabla R.8**).

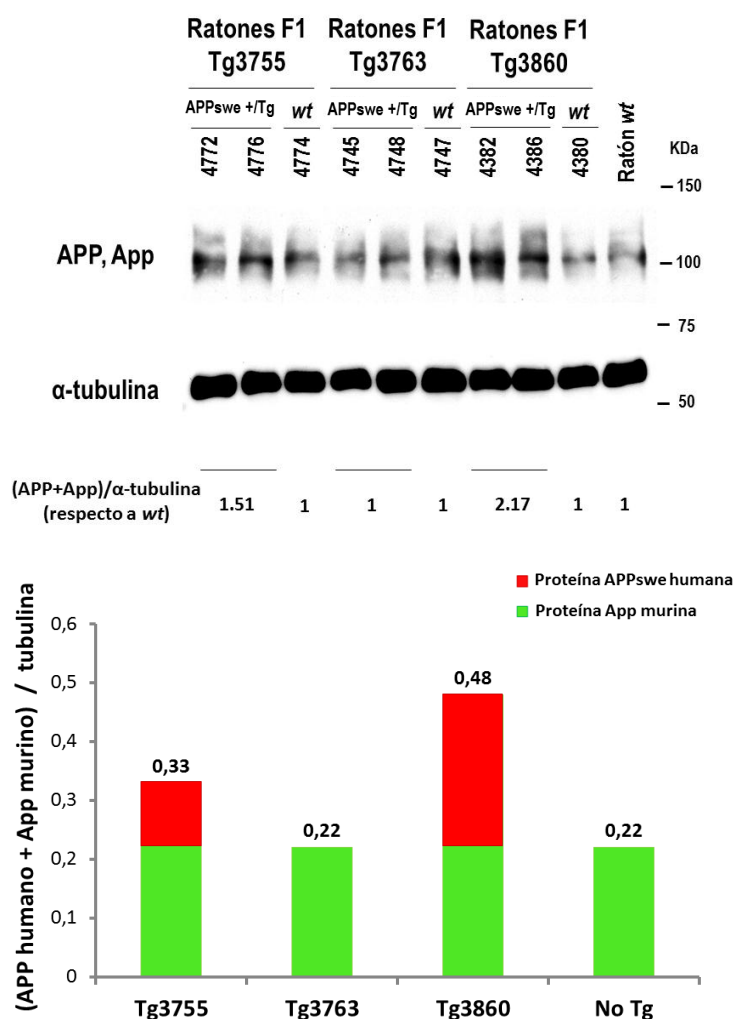


Figura R.59. Detección de los niveles de proteína APP humana y App murina (anticuerpo 22c11) mediante *western blot* en cerebros de ratones transgénicos (Tg3755, Tg3763 y Tg3860). A la izquierda, en la parte de arriba, *western blot* representativo. Cada grupo de ratones Tg3755, Tg3763 y Tg3860 está compuesto por 2 ratones transgénicos (APPswe +/Tg) y 1 hermano de camada no transgénicos (wt) de la segunda generación filial (F2), de dos y tres meses de edad. Se analizaron 50 μ g de proteínas totales extraídas de homogeneizado de cerebro de ratón. Se utilizó el anticuerpo 22c11 para detectar los niveles de proteína APP humana y de proteína App murina. Se muestra un *western blot* de α -tubulina como control de carga de proteína. Los valores numéricos bajo el *western blot* representan los niveles de proteína APP humana mutada y proteína App murina normalizados por α -tubulina de las diferentes líneas respecto a todos los ratones wt (sólo proteína App murina). Ratón wt – Ratón silvestre C57BL/6J. A la izquierda en la parte de abajo se representa, a partir de los datos densitométricos, los niveles de proteína APP humana mutada (rojo) y proteína App murina (verde) normalizados con α -tubulina. Los números encima de las columnas representan los valores densitométricos.

4.4.2.1.4 Nomenclatura oficial de los ratones transgénicos Tg3755, Tg3763 y Tg3860

De acuerdo a las recomendaciones del Comité Internacional para la Nomenclatura genética estandarizada de ratones (<http://jaxmice.jax.org/support/nomenclature/index.html>) (Montoliu & Whitelaw, 2011) los ratones transgénicos Tg3755, Tg3763 y Tg3860 generados tienen la siguiente nomenclatura oficial:

B6.CBA-*Tg*(*APP^{Swe}*)3755Lmon

B6.CBA-*Tg*(*APP^{Swe}*)3763Lmon

B6.CBA-*Tg*(*APP^{Swe}*)3860Lmon

4.4.3 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS

La determinación del número de copias de nuestro YAC se llevó a cabo en la primera generación filial (F1) de cada una de las líneas de ratones transgénicos. Se realizó mediante PCR cuantitativa sobre ADN genómico (Providenti et al., 2006) y mediante *slot blot* (Montoliu, 1997; Giraldo, 2002; Giraldo et al., 2003).

4.4.3.1 qPCR

Para la obtención de la recta patrón del gen *APP* se utilizó ADN genómico humano, y para el control interno (*Profilina1*) ADN genómico de ratón no transgénico (No Tg). Se representó la cantidad de ADN amplificado de cada dilución (10, 2, 0.4 y 0.08 ng) por el valor obtenido de *Ct* tras la PCR cuantitativa, obteniendo de esto modo la ecuación de la recta para cada uno. A continuación se obtuvo la cantidad de ADN amplificado de cada muestra experimental al aplicar los diferentes valores de *Ct* en la ecuación de la recta patrón. Los resultados obtenidos para el gen *APP* se normalizaron con el control interno, generando así la relación entre número de copias del transgén y el control interno (**Figura R.60**). Teniendo en cuenta que el gen de la *Profilina1* se encuentra en homocigosis, las relaciones obtenidas se multiplicaron por dos para obtener el número de copias de nuestro YAC en cada línea transgénica (**Tabla R.8**).

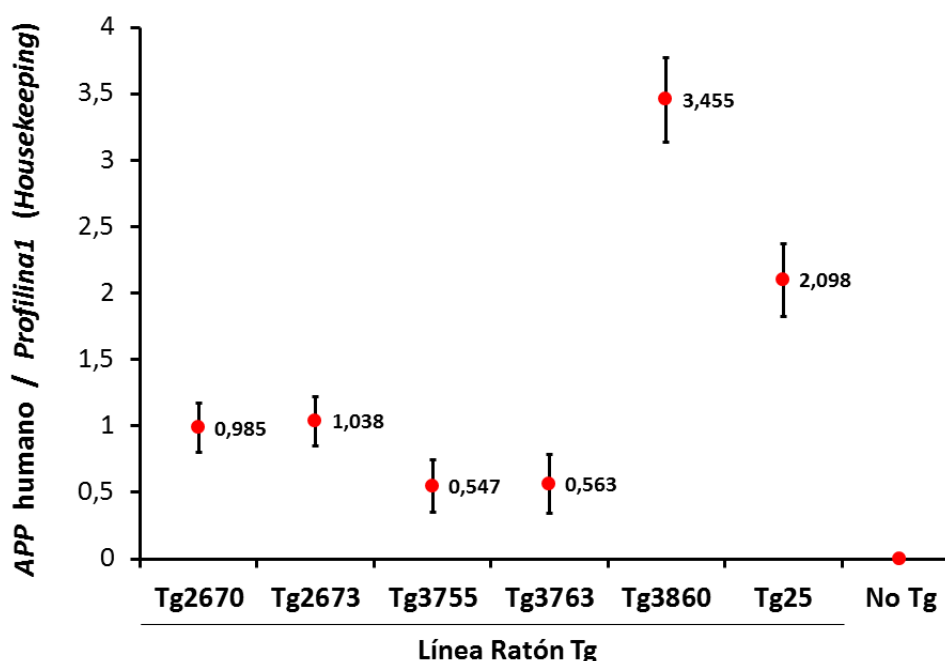


Figura R.60. Cuantificación, mediante qPCR de ADN genómico, del número de copias del YAC en cada línea transgénica. Se utilizó el ADN genómico de 3 ratones de la F1 para cada línea transgénica y se compararon con 3 ratones no transgénicos (No Tg). Los resultados se representan como la media \pm la desviación estándar de cinco experimentos realizados por triplicado. Para la obtención del número de copias los valores se multiplican x2 debido a que el gen *profilina* se encuentra en homocigosis. Valores finales: Tg3755 y Tg3763 \rightarrow 1 copia; Tg2670 y Tg2673 \rightarrow 2 copias; Tg25 \rightarrow 4 copias y Tg3860 \rightarrow 7 copias.

4.4.3.2 Slot blot

Se estimó que una copia del YAC, teniendo en cuenta su tamaño, correspondía a 0.942 ng en 10 µg de ADN genómico de ratón (apartado 3.6.1.2). Siguiendo esta equivalencia se realizó una recta patrón desde 1 hasta 10 copias del YAC y junto a esta recta se analizaron 10 µg del ADN genómico de 3 ratones F1 para cada una de las líneas (**Figura R.61A**). Se representó el número de copias para la recta por el valor densitométrico, obteniendo de esto modo la ecuación de esta recta patrón (**Figura R.61B**). A continuación se obtuvo el número de copias para cada muestra experimental al aplicar los diferentes valores densitométricos en la ecuación de la recta patrón (**Figura R.61C**), corroborando mediante esta técnica el número de copias obtenido mediante qPCR para cada una de las líneas transgénicas (**Figura R.60 y Tabla R.8**).

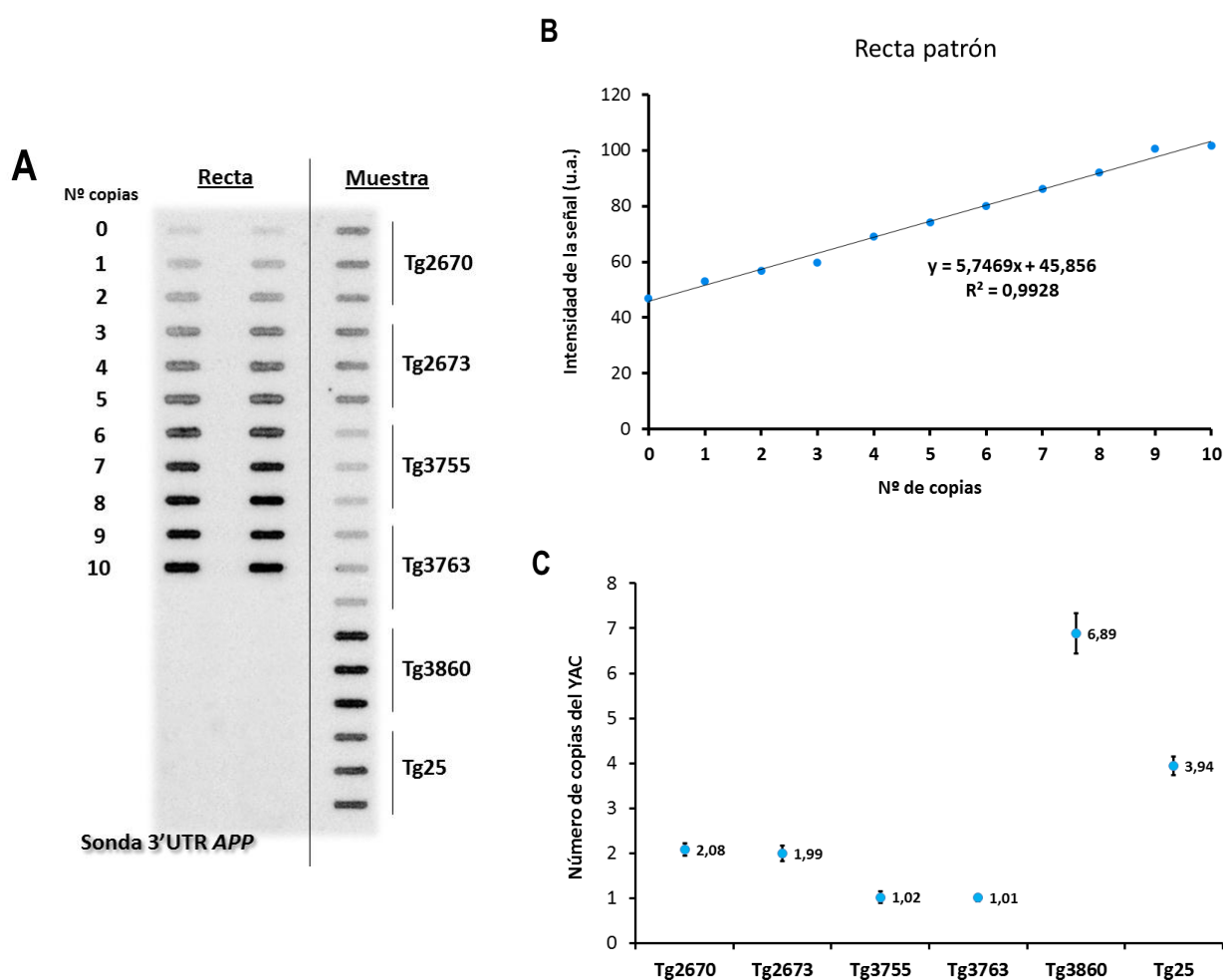


Figura R.61. Cuantificación, mediante slot blot, del número de copias del YAC en cada línea transgénica. En esta figura se muestra, a título de ejemplo, un experimento de los tres realizados para la cuantificación mediante slot blot. (A) Se analizaron 10 µg de ADN genómico de ratón, por triplicado, y se realizó una recta patrón de número de copias, a partir de YAC purificado, en 10 µg de ADN genómico de ratón no transgénico, por duplicado. Se transfirieron estos ADNs a una membrana de nylon y se hibridaron con la sonda 3'UTR del gen APP, obteniendo una intensidad de señal para cada uno. Se utilizó el ADN genómico de tres ratones de la F1 para cada línea transgénica. (B) Recta patrón obtenida a partir de la intensidad de señal y número de copias. Se muestra la ecuación de la recta. (C) Número de copias obtenido para cada línea transgénica aplicando los valores densitométricos obtenidos en la ecuación de la recta patrón.

En la **Tabla R.8** se muestra un resumen sobre el número de copias del YAC, determinado mediante *slot blot* y qPCR; la expresión del gen *APP* en cerebros de ratón, determinado mediante RT-PCR cuantitativa; y cantidad de proteína APP en cerebros de ratón, determinada mediante *western blot* y densitometría, para cada una de las líneas transgénicas generadas durante la tesis doctoral.

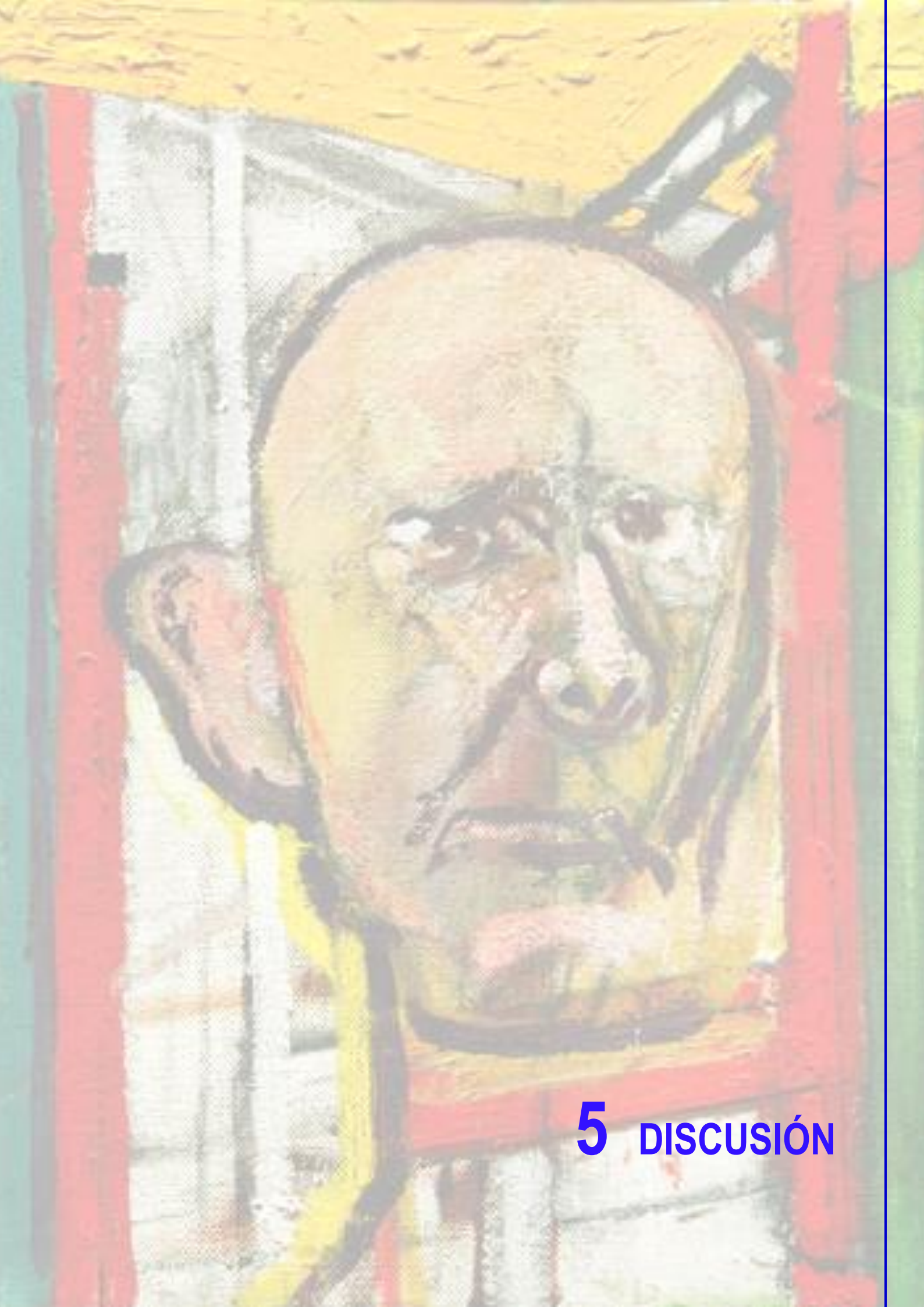
Línea Tg	Técnica Transgénesis	YAC	Tamaño YAC (kb)	Nº copias del YAC*	Expresión del gen APP**	Cantidad proteína APP***
Tg2670	Microinyección	APP ^{wt}	565	2	0.022	-
Tg2673				2	0.017	-
Tg25	Células ES			4	0.69	0.43
Tg3755	Microinyección	APP ^{swe}		1	0.8	0.51
Tg3763				1	0.004	-
Tg3860				7	1.58	1.17

Tabla R.8. Resumen de las diferentes líneas transgénicas generadas. Se representan para las 6 líneas transgénicas: técnica de transgénesis utilizada para cada una de ellas, YAC que contienen integrado en su genoma, tamaño del YAC, número de copias que contienen de dicho YAC en su genoma, expresión del gen *APP* humano en los cerebros respecto a la expresión del gen *App* murino (la expresión se considera 1 para el gen *App* murino) y la cantidad de proteína APP humana en los cerebros respecto a la cantidad de proteína *App* murina (la cantidad se considera 1 para la proteína *App* murina).

*Nº de copias determinado mediante técnicas de qPCR y *slot blot*.

**Expresión del gen *APP* humano en cerebros de ratón obtenido mediante técnica de RT-PCR cuantitativa.

***Cantidad de proteína APP humana en cerebros de ratón obtenida mediante técnica de *western blot* y posterior densitometría. La marca "-" indica que, mediante esta técnica de *western blot*, no se detectan niveles de proteína APP humana.



5 DISCUSIÓN

1998. Autorretrato de William Utermohlen

Galería Beckel Odille Boïcos, París

El autorretrato de 1998 representa la cabeza del artista enmarcada en un rectángulo. La cabeza flota separada del cuerpo. Este será el último autorretrato de William en el que las facciones del artista son aún reconocibles.

5.1 OBTENCIÓN DEL YAC APP^{wt}, PORTADOR DEL LOCUS DEL GEN APP SILVESTRE

La generación de YACs (Murray & Szostack, 1983) ha permitido su uso como vectores de clonación de grandes secuencias de ADN (Burke et al., 1987) y posteriormente, para la generación de genotecas genómicas de humano y de ratón, con secuencias que normalmente oscilan entre las 200 kb y 1 Mb (Burke & Olson, 1991; Larin et al., 1991). Fue a partir de entonces cuando se empezaron a utilizar los YACs en la generación de ratones transgénicos, ya que permitía introducir grandes segmentos de ADN (Schedl et al., 1992; Montoliu et al., 1993; Schedl et al., 1993a; Schedl et al., 1993b), consiguiendo la correcta expresión espacio-temporal del transgén al incluir el locus completo con sus regiones reguladoras (Dillon & Sabbattini, 2000; Giraldo & Montoliu, 2001).

La principal ventaja del uso de YACs como vectores eucariotas consiste, como ya se ha mencionado, en el clonaje de grandes secuencias de ADN. Esto es debido a que el YAC se comporta como un cromosoma endógeno de la levadura, siendo capaz de mantenerse y expandirse con relativa rapidez debido a que el ciclo de replicación de la propia levadura es de 90 minutos en condiciones nutritivas favorables. También se ha convertido en una herramienta útil debido a que se puede aprovechar la maquinaria de las levaduras para la modificación del YAC mediante el sistema de recombinación homóloga propio de éstas (Schlessinger, 1990; Green et al., 1999; Giraldo et al., 1999), permitiendo diferentes cambios en la secuencia del YAC. Entre las diferentes modificaciones que se pueden llevar a cabo están: los procesos de eliminación de grandes secuencias de ADN del YAC, como en el método de fragmentación cromosómica (Vollrath et al., 1988; Gerring et al., 1991; Schedl et al., 1993b; Montoliu et al., 1996); la incorporación de secuencias, como es el caso de la integración del gen que confiere resistencia a neomicina para la posterior selección tras la transfección en células de mamífero (Riley et al., 1992; Davies et al., 1992) e incluso modificaciones de forma precisa y limpia de uno o varios nucleótidos (introducción de mutaciones) usando métodos como el *Pop-in/Pop-out* (Duff et al., 1996; Giraldo et al., 1999). Todos los métodos descritos se basan en el reconocimiento de determinadas secuencias de homología para que se produzca una correcta recombinación. Sin embargo, una de las desventajas del uso de YACs consiste en que, durante los mismos procesos de recombinación homóloga, se pueden dar procesos de delección y/o reordenamiento cromosómico, lo cual requiere un análisis más minucioso y exhaustivo de los clones portadores del nuevo YAC modificado, con objeto de verificar que, a parte de la mutación deseada, el resto del YAC sigue intacto.

Una de las primeras aproximaciones para el estudio de la EA consistió en la generación de ratones transgénicos que contuvieran el locus genómico del gen *APP* humano. Esto se logró a partir del clon de levadura B142F9, portador del YAC APP-8, descrito con un tamaño aproximado de 650 kb, que incluía el gen *APP* completo (Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993) pero del que se ignoraba si contenía en sus regiones colindantes otros genes que pudieran interferir en el correcto desarrollo y caracterización del nuevo modelo. La publicación de la secuencia del genoma humano (Pennisi, 2000; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) y estudios adicionales sobre el YAC del clon B142F9 (Lamb et al., 1997; Kulnane & Lamb, 2001) pusieron de manifiesto que el YAC, además de contener la secuencia completa del gen *APP*, también contenía la del gen *GABPA* (Lamb et al., 1997), que codificaba para la subunidad E4TF1-60 de unión a ADN, también llamada GABPA, del factor de transcripción E4TF1, implicada en la regulación de la expresión de determinados genes. Por lo tanto, debido a que GABPA podría estar generando un fenotipo indeseado en los ratones generados, o incluso interferir en la expresión del propio gen *APP*, se planteó el primer objetivo de esta tesis, que consistía en la necesidad de modificar el YAC APP-8 con la finalidad de eliminar el gen *GABPA* situado en el extremo 3' del YAC, respetando en todo momento las regiones codificantes y reguladoras del gen *APP*.

La descripción del tamaño del YAC APP-8 se realizó en el año 1993 en base a la migración electroforética del YAC en una PFGE, estimando un tamaño aproximado de 650 kb (Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993). Para abordar el primer objetivo, se planteó en primer lugar, gracias al conocimiento de la secuencia completa del genoma humano (Pennisi, 2000; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) y las técnicas moleculares actuales, la delimitación del YAC por ambos extremos y con ello la determinación de su tamaño exacto. Esta delimitación, llevada a cabo mediante la técnica de PCR y posterior secuenciación, puso de manifiesto que el tamaño exacto del YAC era de 610570 pb (610 kb) (**Figura R.2**).

Mediante el análisis del YAC llevado a cabo por PFGE del clon B142F9, se pudo apreciar la comigración del YAC con un cromosoma endógeno de la propia levadura, que se encontraba en la cepa AB1380, lo que podría acarrear un problema en el futuro paso de purificación de DNA del YAC debido a la posible contaminación de éste con el cromosoma endógeno. Es por todo esto que se decidió transferir el YAC APP-8 del clon B142F9 con genotipo AB1380, a la cepa de levadura YLBW4 denominada *window* y diseñada exclusivamente para solventar este problema (Hamer et al., 1995) (**Figura R.3**). Este paso de transferencia llevado a cabo por el método *kar-crossing* (Hugerat et al., 1994; Spencer et al., 1994) resultó sencillo, obteniéndose un total de 21 colonias, que con un simple análisis mediante PCR, permitió identificar aquellas colonias que únicamente contenían el genotipo

YLBW4 de interés (**Figura R.4A**), con lo que se obtuvo un total de 5 colonias potencialmente positivas (**Figura R.4B**). Sin embargo, el análisis exhaustivo y sistemático requerido en los clones de levadura tras un proceso de este tipo, realizado mediante técnica de PCR, *Southern Blot* y PFGE, reveló que 2 de los 5 clones habían sufrido modificaciones espontáneas en el YAC (**Figura R.4C, R.5 y R.6A**). De los 21 clones obtenidos tras el proceso de *kar-cross*, 3 resultaron positivos (14%), demostrando, al igual que en estudios previos (Hugerat et al., 1994; Spencer et al., 1994), que la transferencia de YACs mediante este procedimiento se trata de un método eficiente y reproducible, a la vez que se trata de un método fiable para transferir YACs a una cepa de levadura *window* (Hamer et al., 1995). De estos 3 clones se optó por la selección del clon B142F9W4-6 (**Figura R.6B**) para el siguiente paso de modificación del YAC.

El siguiente paso consistió en una recombinación homóloga con el fin de introducir el gen *neo* en el brazo Ura, situado en el extremo 5' del YAC; a la vez que se integra el nuevo marcador *lys2* y se inactiva el gen *ura3*. Si tras la modificación del YAC que se va a llevar a cabo, se decidiera purificar e introducir en células de mamífero para la posible generación de ratones transgénicos por el método de células ES, se haría necesaria la selección, mediante este gen *neo*, de las células portadoras de dicho YAC. Así, se decidió usar el vector pRV1 de 12.5 kb, diseñado para facilitar la recombinación homóloga en levaduras (Srivastava & Schlessinger, 1991), ya que una vez linealizado (9.5 kb) y debido a que contiene secuencias homólogas para el YAC APP-8 (gen *ura3*), permite la integración de éste (Orr-Weaver et al., 1983) y con ello del gen *neo* y del gen de selección auxotrófico *lys2* (**Figura R.7**). Para esta recombinación homóloga se usó el método del AcLi (Ito et al., 1983) proporcionando un número pequeño de colonias, pero resultando muy eficiente. De las 6 colonias obtenidas y analizadas se obtuvieron 5 positivas (83%). Cabe destacar que durante el proceso de recombinación es habitual que aproximadamente el 50% de las colonias recombinantes positivas para la transformación, hayan incorporado múltiples copias en tándem del plásmido (Orr-Weaver & Szostak, 1983a). En este caso, las 5 colonias obtenidas habían incorporado sólo una copia del plásmido. El análisis de las distintas colonias obtenidas se realizó, en primer lugar, por el método de la PCR, mediante el cual se pueden discriminar colonias negativas rápidamente y de ese modo acelerar el proceso de comprobación. El análisis por PCR aportó información respecto a la integración del gen *neo*, sobre distintas secuencias que debían mantenerse en el YAC, y si se había producido la integración en el lugar esperado (**Figura R.8A y R.8B**). Esto permitió el descarte del clon APPneoW4-5 (**Figura R.8A**). El análisis mediante PFGE y *Southern Blot* (**Figura R.9 y R.10**), permitió comprobar la incorporación del gen *neo* en el YAC en los 5 clones que habían resultado positivos para el análisis mediante PCR, además de la conservación del patrón de bandas en la región codificante del gen *APP*

respecto al clon B142F9 original (**Figura R.9**). Recombinaciones en distintos lugares o integraciones de secuencias (Orr-Weaver et al., 1981; Orr-Weaver & Szostak, 1983a) pudieron ser las responsables de la aparición del falso positivo. El clon APPneoW4-1 se seleccionó como clon apto para proseguir el proceso sometiéndose a la siguiente ronda de recombinación.

Esta recombinación homóloga realizada en el brazo Ura del YAC supuso la adición de aproximadamente 10 kb en el mismo (**Figura R.7 y R.10**). Se mantuvo intacta la región de secuencia humana en 5' del YAC, que contenía regiones reguladoras del gen *APP*, con el fin de que se permitiera una correcta expresión de dicho gen tal y como se había descrito con anterioridad (Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993). Aunque hasta la fecha sólo se han descrito elementos reguladores del gen *APP* en el promotor proximal del gen (Quitschke, 1994; Vostrov et al., 1995; Quitschke et al., 1996), la existencia de otros elementos reguladores más alejados, como elementos aisladores o *enhancer*, se considera indudable (Dillon & Sabbattini, 2000). De ahí que, para conseguir una correcta expresión espacio-temporal del gen, la recombinación se haya llevado a cabo manteniendo intacta en todo momento la región 5' donde se encuentran elementos evolutivamente conservados, muy probablemente relevantes para la expresión del locus (**Figura D.1**).

Para llevar a cabo el siguiente proceso de recombinación homóloga, la elección de una secuencia correcta iba a resultar determinante en la propia eficiencia de recombinación (Sikorski & Hieter, 1989), puesto que se requería que dicha secuencia fuese de un tamaño entre 1 y 2 kb (Orr-Weaver & Szostak, 1983b; Pavan et al., 1990a) y contuviera secuencias de ADN únicas. Para esta última condición era imprescindible determinar las secuencias repetitivas (Ohno, 1972; Lander et al. 2001; Kidwell, 2002) a lo largo del YAC, evitando su utilización para el proceso de recombinación debido a que podría provocar recombinaciones en lugares no deseados. La utilización del programa bioinformático *RepeatMasker* permitió la eliminación de estas secuencias repetitivas y, gracias a ello, la selección de dos secuencias de aproximadamente 1.5 y 2 kb en la región de interés. Sin embargo, mediante un nuevo análisis que consistía en una matriz de homología entre las 2 secuencias seleccionadas y toda la estructura del YAC, realizado con el programa *MacVector*, se pudo comprobar que una de las secuencias (secuencia B) presentaba un alto grado de homología con el YAC a lo largo de toda su secuencia, lo que condujo al descarte de ésta (**Figura R.11B**); y que un extremo de la otra secuencia (secuencia A) también presentaba homología, por lo que también se produjo la eliminación de dicho extremo, dejando un tamaño de aproximadamente 1 kb de la secuencia A, suficiente para el proceso de recombinación (**Figura R.11A**). A partir de esta secuencia A de homología, se generó el vector de recombinación pYAC4'-SecA-Leu de 9.1 kb, ya que una vez linealizado (8.7 kb) (**Figura R.12**) y debido a que contiene en uno de sus extremos esta secuencia A

homóloga para el YAC APP-8, permite la fragmentación de éste (Orr-Weaver et al., 1983; Vollrath et al., 1988; Gerring et al., 1991; Schedl et al., 1993b) y con ello la eliminación del gen *GABPA* (Figura R.13).

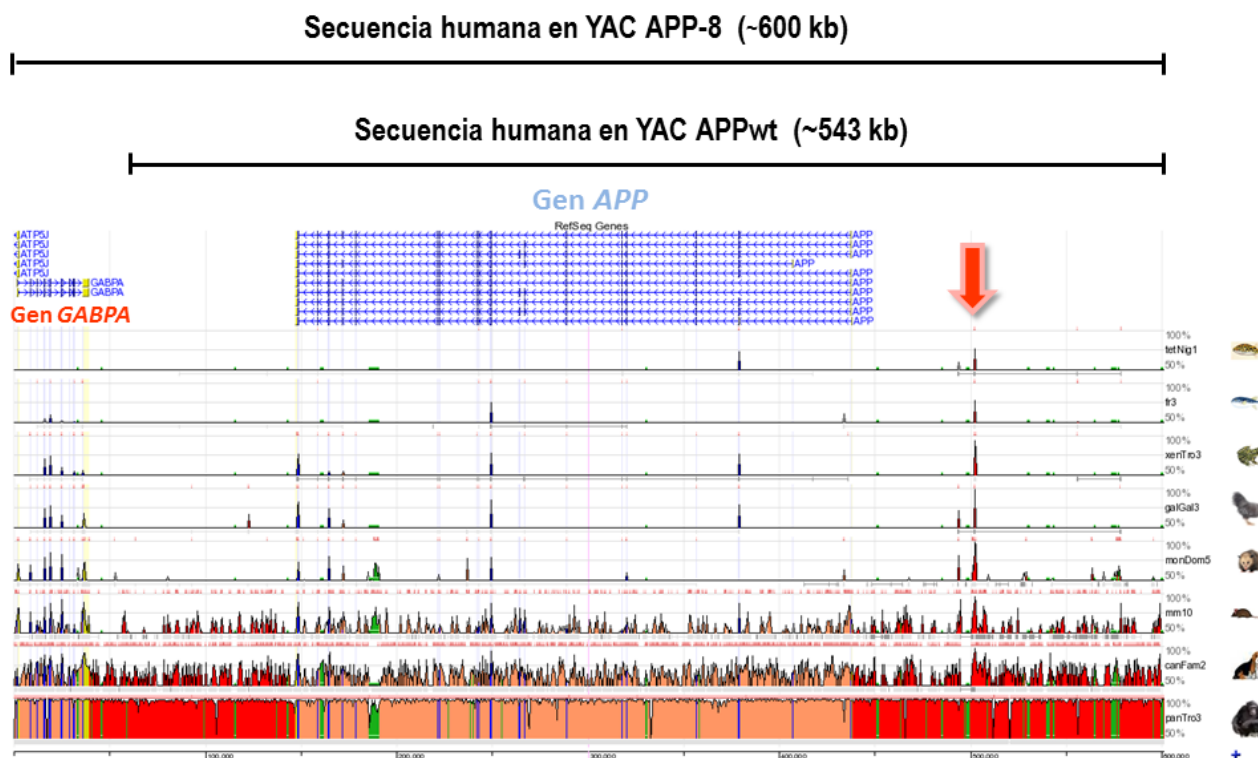


Figura D.1. Estudio de regiones evolutivamente conservadas en la secuencia del YAC. Se representa el alineamiento de la secuencia humana presente en el YAC APP-8 con otras ocho especies cuyos genomas se encuentran secuenciados. La longitud de la línea de alineamiento horizontal para cada especie se corresponde a la longitud de alineación de la secuencia de bases con el humano, mientras que el eje vertical de cada especie se corresponde con el nivel de identidad de nucleótidos en esta alineación (arriba representa un 100% de identidad). El color rojo indica regiones intergénicas, el color salmón regiones intrónicas, el azul exones, el amarillo UTRs, y el verde transposones. La flecha roja de la figura indica una región intergénica evolutivamente conservada en las ocho especies estudiadas, que se encuentra en la región 5' del YAC, muy probablemente relevante para la expresión del gen *APP*. Los animales que se incluyeron en el estudio, de arriba a abajo, son los siguientes: *Tetraodon nigroviridis*, *Fugu rubripes* (Pez globo), *Xenopus tropicalis*, *Gallus gallus domesticus* (Gallo), *Monodelphis domestica* (Zarigüeya), *Mus musculus* (Ratón común), *Canis lupus familiaris* (Perro) y *Pan troglodytes* (Chimpancé común). Alineamiento realizado con el programa *ECR Browser* (<http://ecrbrowser.dcode.org/>).

El gen *GABPA*, presente junto al gen *APP* en el YAC procedente del clon original B142F9, codifica para la subunidad de unión a ADN de un factor de transcripción (Watanabe et al., 1990; Watanabe et al., 1993) y se piensa que su expresión en el ratón transgénico, generado a partir de este YAC, podría interferir en la propia expresión del gen *APP* o también influir, de una forma todavía desconocida, en el correcto desarrollo del ratón, pudiendo interferir en el proceso de fenotipación o caracterización de éste (Lamb et al., 1997), haciendo imposible asegurar cual de los genes es el responsable de dicho fenotipo. Este es el motivo por el que se procedió a realizar la segunda ronda de recombinación, en la que mediante fragmentación cromosómica, se trataba de eliminar dicho gen *GABPA* (Figura R.13), con el propósito final de generar, a partir del YAC que sólo contuviera el locus

del gen *APP*, un nuevo modelo animal que permitiera mimetizar la situación de los pacientes de la enfermedad esporádica.

Esta segunda recombinación homóloga realizada en la región 3' del YAC resultó un proceso más complicado que la primera, obteniéndose índices de recombinación próximos a los descritos con anterioridad (Orr-Weaver & Szostak, 1983b). La dificultad de esta fragmentación podría venir provocada por la presencia de estructuras secundarias de ADN en la región 3' que hayan hecho el acceso más complicado a las secuencias de recombinación (Orr-Weaver & Szostak, 1983b; Pavan et al., 1990a; Pavan et al., 1990b; Reeves et al., 1990). De las 122 colonias obtenidas mediante el método del AcLi, se analizaron 50, obteniendo 5 clones que presentaban una correcta recombinación en el lugar esperado (10%). Se procedió al análisis de los clones de manera similar a la primera recombinación, se diseñaron una serie de experimentos para comprobar, de forma fehaciente, la correcta recombinación homóloga y la eliminación del gen *GABPA*. La primera selección de colonias se realizó mediante dos PCRs (**Figura R.14**). Este método permitió discriminar colonias negativas de forma rápida. Aunque, aparentemente, las colonias que no presentaban el gen *GABPA* pero sí el exón 6 del gen *APP* deberían considerarse adecuadas, una PCR híbrida en la región de recombinación demostró que esto no era siempre así (**Figura R.15**).

Finalmente, el análisis mediante PFGE y posterior hibridación de los filtros con una sonda del ADNc del gen *APP* y del gen *GABPA*, resultó ser el análisis más contundente y fiable de todos, ya que el cambio en la movilidad electroforética del YAC APPwt (descenso de 55 kb) sólo podía ser debido a una fragmentación del YAC en los 5 clones analizados (Pavan et al., 1990a; Pavan et al., 1990b; Reeves et al., 1990). La comprobación mediante hibridación de la desaparición del gen *GABPA*, junto al cambio de movilidad electroforética mencionado (**Figura R.16**) y el uso de la técnica de *Southern blot*, que permitió comprobar la conservación del patrón de bandas en la región codificante del gen *APP* (**Figura R.17**), además de que el entorno de la secuencia de recombinación presentaba el patrón de bandas específico de la recombinación (**Figura R.18 y R.19**); supuso la confirmación de que las 5 colonias habían sufrido la recombinación planificada. Se procedió a la selección del clon W4c19 para la purificación de este YAC APPwt y posterior generación de un ratón transgénico susceptible de servir de modelo a investigaciones sobre la enfermedad de Alzheimer esporádica. Además, se seleccionó también este clon para introducir la mutación “Sueca” en el YAC mediante la técnica de *Pop-in/Pop-out*.

5.2 OBTENCIÓN DEL YAC APP^{swe}, PORTADOR DEL LOCUS DEL GEN APP CON LA MUTACIÓN “SUECA”

Mediante la consecución del clon W4c19 se ha podido comprobar que la modificación de YACs se puede realizar de una forma relativamente sencilla gracias al eficiente sistema de recombinación homóloga que funciona en las células de levadura. Este clon W4c19, que portaba el YAC APP^{wt} de 565 kb, era el resultado de estos procesos de recombinación homóloga en levaduras que habían supuesto, como resultado final, la consecución del primer objetivo planteado en la tesis doctoral: la eliminación del gen que codifica para el factor de transcripción GABPA en el YAC que contiene el locus completo del gen *APP* humano. Una vez logrado el primer objetivo de la tesis se decidió abordar el segundo objetivo, que consistía en la introducción de la mutación “Sueca” en el gen *APP* del YAC APP^{wt}.

La incorporación de mutaciones de cualquier naturaleza en la secuencia de YACs se ha llevado a cabo mediante diferentes métodos, pero aprovechando, todos ellos, el sistema de recombinación homóloga propio de las células de levadura (Schlessigner, 1990; Monaco & Larin, 1994; Peterson, 1997; Green et al., 1999; Giraldo & Montoliu, 2001). Se han llevado a cabo delecciones en el YAC sustituyendo la secuencia deseada por un nuevo marcador de selección auxotrófico (Montoliu et al., 1996), con el único inconveniente de que este método deja integrado el marcador y puede interferir con la expresión del transgén (Bonifer, 2000). Mediante el método de *Pop-in/Pop-out* se ha llegado a solventar este problema, ya que permite la delección de una determinada secuencia de forma limpia y precisa (Giraldo, 2002). Este método de *Pop-in/Pop-out* se ha empleado también en YACs para insertar genes indicadores (Hiemisch et al., 1997; Ainscough et al., 1997; Vassaux & Huxley, 1997), para introducir repeticiones de trinucleótidos con el fin de generar modelos de enfermedades humanas (La Spada et al., 1998; Hodgson et al., 1999; Cemal et al., 1999) o para introducir mutaciones puntuales (Duff et al., 1994; McCormick et al., 1995; Lamb et al., 1997). Es por esta última razón que se decidió utilizar este método para generar un YAC que contuviera la doble mutación puntual en el codón 670 y 671 del gen *APP* humano, llamada mutación “Sueca” (Mullan et al., 1992). Se decidió introducir la mutación “Sueca” en el gen *APP* del YAC por ser una de las primeras mutaciones descritas en familias de EA de aparición temprana y ser la mutación a partir de la cual se han generado mayor número de modelos animales para el estudio de la EA.

La elección de una secuencia de un tamaño entre 1 y 2 kb (Orr-Weaver & Szostak, 1983b; Pavan et al., 1990a) y secuencia de ADN única que contuviera los nucleótidos a modificar eran condiciones indispensables para la introducción de la mutación mediante recombinación homóloga

(Duff & Huxley, 1996). Se utilizó el programa bioinformático *RepeatMasker* para la localización de secuencias repetitivas en el entorno del exón 16 del gen *APP*, lugar donde se encuentran los nucleótidos a modificar; seleccionando finalmente una secuencia de 1.4 kb de tamaño, en la que estos nucleótidos a modificar se encontraban aproximadamente en el punto intermedio, dejando unos 700 pb a cada lado. Un segundo análisis con el programa *MacVector*, realizando una matriz de homología entre la secuencia seleccionada y toda la estructura del YAC, puso de manifiesto una región con un alto grado de homología entre esta secuencia y toda la estructura del YAC a partir de la posición 900 (**Figura R.20**). Esta región tenía que ser eliminada para que fuera una secuencia única y con ello aumentar la eficiencia en los procesos de recombinación, por lo que se decidió acotar la secuencia hasta la posición 902, dejando finalmente las aproximadamente 700 pb de la zona anterior a la mutación, y unas 200 pb de la zona posterior. Para modificar los dos nucleótidos que se corresponden con la mutación “Sueca” en el gen *APP*, se introdujo esta secuencia en el plásmido pRS306, que contiene el marcador de auxotrofia *ura3*, y se realizó el proceso de mutagénesis dirigida, resultando un método sencillo para la obtención del plásmido portador de la mutación “Sueca” y observando la alta eficiencia de mutagénesis (100%). Se generó así el plásmido de recombinación pRS306-gAPP16swe de 5.2 kb (**Figura R.21**), y a continuación se hizo lineal para el proceso de recombinación. Debido a que contiene la secuencia homóloga para el YAC *APPwt*, permite la integración del vector completo en éste (Giraldo et al, 1999; Giraldo, 2002) generándose el clon *Pop-in* con la zona de homología duplicada: una con la original y la otra con la mutación (**Figura R.22A**).

Esta tercera recombinación homóloga resultó, en términos de eficiencia, un proceso similar a la segunda recombinación, obteniendo índices de recombinación próximos a los descritos con anterioridad (Orr-Weaver & Szostak, 1983b). De las más de 300 colonias obtenidas mediante el método del AcLi, se analizaron 24, obteniendo 5 clones que presentaban una correcta recombinación en el lugar esperado (21%). De estos clones, 2 habían incorporado una copia del plásmido (W4c19PI-14 y 20), mientras que los otros 3 seguramente habían incorporado múltiples copias en tándem del plásmido (W4c19PI-10, 13 y 17) (**Figura R.26**), algo habitual en los procesos de transformación de levaduras (Orr-Weaver & Szostak, 1983a). Se procedió al análisis sistemático, realizado tras procesos de recombinación en levaduras, para comprobar que se había producido una correcta recombinación homóloga en el lugar esperado. La primera selección de colonias se realizó mediante tres PCRs (**Figura R.23**) permitiendo discriminar colonias negativas de forma rápida. El análisis mediante PFGE y posterior hibridación de los filtros con una sonda del ADNc del gen *APP* permitió observar el aumento de tamaño, respecto al clon W4c19, de los YACs de los 5 clones analizados, observándose que el clon W4c19PI-17 había sufrido el mayor incremento de tamaño, seguido de los clones

W4c19PI-10, 13, 14 y 20 (**Figura R.24**). En estos dos últimos clones se podía observar que su tamaño era prácticamente el mismo. Este incremento en los diferentes YACs APP-POP/IN se podía explicar por la integración de diferente número de copias del plásmido de recombinación, habiendo incorporado más copias el clon W4c19PI-17 y menos los clones W4c19PI-14 y 20. El uso de la técnica de *Southern blot* permitió comprobar que el entorno de la secuencia de recombinación presentaba el patrón de bandas específico de la recombinación para los clones W4c19PI-14 y 20 (**Figura R.25 y R.26**). Sin embargo, para los clones W4c19PI-10, 13, y 17 se observaba una banda adicional correspondiente al tamaño del plásmido (5.2 kb), o bien un aumento del tamaño de la región de recombinación que sugería que estos clones habían incorporado copias en tándem del plásmido de recombinación, habiendo incorporado más copias el clon W4c19PI-17, seguido del clon W4c19PI-10 y W4c19PI-13 (**Figura R.25 y R.26**), de la misma forma que se pudo observar mediante PFGE (**Figura R.24**). Estas dos técnicas permitieron confirmar que las 5 colonias habían sufrido la recombinación en el lugar deseado. Se procedió a la selección del clon W4c19PI-20 para la cuarta ronda de recombinación homóloga llevada a cabo durante esta tesis doctoral.

Una vez obtenido el YAC APP-POP/IN, cuya zona de homología queda duplicada debido a que permanece la secuencia original que estaba presente en el YAC APPwt de partida y aparece la secuencia mutante que portaba el plásmido; se procedió a la siguiente ronda de recombinación para la obtención de los clones *Pop-out*, que finalmente deberían contener el YAC APPswe con la secuencia del exón 16 del gen *APP* portadora de la mutación “Sueca”. La adición de uracilo al medio de selección es capaz de promover la recombinación homóloga y pérdida del marcador auxotrófico (*ura3*) integrado en la recombinación anterior, ya que no se requiere para la viabilidad de la levadura. Este paso de recombinación homóloga se puede dar a dos niveles y con la misma probabilidad (Giraldo et al., 1999; Giraldo, 2002): en una se obtiene de nuevo el YAC APPwt de partida y en la otra se obtiene el YAC APPswe de interés (**Figura R.22B**). La selección a través del marcador de selección negativo 5-FOA permitió identificar aquellos clones que habían eliminado el marcador *ura3* (Adams et al., 1997; Giraldo, 2002) y por tanto eran clones recombinantes potencialmente positivos para este proceso de recombinación homóloga. De las 3 colonias obtenidas y analizadas se observó que las 3 habían sufrido la recombinación esperada (100%). Y dentro de las 3 colonias, 2 contenían la secuencia del exón 16 con la mutación (66%). Se procedió al análisis sistemático, realizado tras procesos de recombinación en levaduras, para comprobar que se había producido una correcta recombinación homóloga en el lugar esperado en las 3 colonias obtenidas. Se realizó, en primer lugar, el análisis mediante PCR. Se llevaron a cabo tres PCRs que permitieron comprobar que el proceso de recombinación se había producido en el lugar esperado (**Figura R.27**). Análisis posteriores, mediante

restricción enzimática y secuenciación, permitieron confirmar que 2 clones eran portadores del YAC APP^{swe} y 1 clon era portador del YAC de partida APP^{wt} (**Figura R.28 y R.29**). El análisis conjunto de ambas técnicas resultó concluyente para la detección de la secuencia mutada. El análisis mediante PFGE sobre estos clones permitió comprobar que el tamaño del YAC volvía a ser el mismo que el YAC de partida (565 kb) (**Figura R.31**) y el análisis mediante *Southern Blot* demostró que el entorno de la secuencia de recombinación presentaba el patrón de bandas específico tras una correcta recombinación, y que se correspondía con el patrón observado en el clon de partida W4c19 (**Figura R.32**). Además, dicho análisis también puso de manifiesto la conservación del patrón de bandas en la región codificante del gen *APP* en los 2 clones mutantes respecto a los diferentes clones obtenidos en los pasos de recombinación y el clon B142F9 original (**Figura R.33**). Se procedió a la selección del clon W4c19^{swe} (W4c19PO-1) para la purificación de este YAC APP^{swe} y posterior generación de un ratón transgénico susceptible de servir de modelo a investigaciones sobre la enfermedad de Alzheimer familiar que contuviera exactamente la misma secuencia, con la única diferencia de la región mutada, que el modelo generado para la enfermedad de Alzheimer esporádica, de tal forma que se pudiera realizar un análisis conjunto de ambos modelos que permitiera comparar la etiología y características propias de estos dos tipos de enfermedad descritas para la enfermedad de Alzheimer.

Los diferentes procesos llevados a cabo en levaduras durante la presente tesis doctoral han resultado un éxito para la consecución de los primeros objetivos planteados en el estudio. Los mecanismos de recombinación homóloga propios de levadura han resultado indispensables para la obtención de los diferentes clones, cada uno de los cuales resultaban necesarios como paso previo para la obtención de dichos objetivos (**Figura R.34**).

5.3 GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS MEDIANTE MICROINYECCIÓN Y TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS ES

Existen básicamente cuatro métodos para la generación de ratones transgénicos mediante el uso de YACs. Dos de estos métodos se basan en el uso de células embrionarias pluripotentes (células ES): uno mediante la fusión de esferoplastos con células ES (Jakobovits et al., 1993; Pearson & Choi, 1993) y el otro por transfección mediada por liposomas en células ES (Lamb et al., 1993; Strauss et al., 1993). Otro método más reciente consiste en la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en el que se usan las cabezas de los espermatozoides con las membranas dañadas, envueltas con el ADN del YAC, como vehículos para la generación de ratones transgénicos (Moreira et al., 2004;

Moreira et al., 2006). En dicho método se obtienen eficiencias de transgénesis más elevadas, pero también se observa un mayor número de fundadores con la integración parcial de transgenes de gran tamaño, cuya integridad se ve comprometida durante el proceso de ICSI (Moreira et al., 2007). Sin embargo, el método más utilizado de todos, a pesar de las bajas eficiencias observadas en transgénesis (Montoliu et al., 1996; Chan, 1999), ha sido la microinyección de pronúcleos de oocitos fecundados (Schedl et al., 1993a; Schedl et al., 1993b; Montoliu et al., 1996; Giraldo & Montoliu, 2001; Giraldo, 2002), debido posiblemente a que su metodología fue la primera en describirse y es un procedimiento relativamente sencillo y robusto.

En la presente investigación se decidió utilizar el método de microinyección de pronúcleos de oocitos fecundados (**Figura R.36**), para la generación de ratones transgénicos, con el YAC APP^{w^t} y con el YAC APP^{swe} purificados (**Figura R.35**). Dicho método fue llevado a cabo por el servicio de Transgénesis del CNB-CBMSO-CSIC en Madrid. Los oocitos fecundados microinyectados fueron B6CBAF2, con los que se obtienen mayores eficiencias de transgénesis que usando cepas consanguíneas (Auerbach et al., 2003).

Para la microinyección con el YAC APP^{w^t} se obtuvo una eficiencia de transgénesis (medida como número de ratones positivos transgénicos entre las crías nacidas totales) ligeramente inferior a lo descrito anteriormente, que oscilaba entre el 5-20% (Schedl et al., 1993a; Schedl et al., 1993b; Giraldo & Montoliu, 2001; Giraldo, 2002). Concretamente, de los 127 ratones obtenidos mediante esta técnica de microinyección con el ADN purificado del YAC APP^{w^t}, 5 resultaron transgénicos (4%) (**Tabla R.1**). Eficiencias de transgénesis inferiores al 5% se pueden explicar a que durante el proceso de purificación de ADN del YAC se hayan producido contaminaciones (Giraldo & Montoliu, 2001). De estos 5 ratones que habían incorporado algún fragmento de ADN del transgén, se obtuvieron 2 que portaban la secuencia completa del YAC APP^{w^t} (**Tabla R.1**), lo que supone, aproximadamente, un 1.5% de todos los ratones analizados y un 40% de los transgénicos, cifra que se encuentra entre el 20-70% descrito con anterioridad (Giraldo & Montoliu, 2001).

Sin embargo, para la microinyección del YAC APP^{swe}, se obtuvo una eficiencia de transgénesis que sí se encontraba entre el 5-20% (Schedl et al., 1993a; Schedl et al., 1993b; Giraldo & Montoliu, 2001; Giraldo, 2002). Concretamente, de los 95 ratones obtenidos mediante esta técnica de microinyección con el ADN purificado del YAC APP^{swe}, 10 resultaron transgénicos (11%) (**Tabla R.5**) y de los cuales 3 se consideraron que portaban la secuencia completa del YAC APP^{swe} (**Tabla R.5**) lo que supone, aproximadamente, un 3% de todos los ratones analizados y un 30% de los

transgénicos, cifra que se encuentra entre el 20-70% descrito con anterioridad (Giraldo & Montoliu, 2001).

La comprobación de la integración completa de ambas construcciones de 565 kb en el genoma del ratón requirió un análisis meticuloso a lo largo de toda la secuencia, para lo cual se realizaron un total de veintiocho PCRs, a cada ratón identificado previamente como transgénico, a lo largo de todo el YAC. Esta batería de PCRs diseñada para la comprobación de la integración completa del YAC resultó positiva para los ratones 2670 y 2673 generados con el YAC APP^{wf} (**Figura R.38 y Tabla R.2**), lo que identificaba a estos ratones, como los dos posibles fundadores (F0) del nuevo modelo animal de la enfermedad de Alzheimer esporádica. Para los ratones generados con el YAC APP^{swe} resultaron las veintiocho PCRs positivas para los ratones 3763 y 3860, y veintiséis para el ratón 3755 (**Tabla R.6**), que se decidió clasificar como posible fundador, junto a los ratones 3763 y 3860, debido a que simplemente había perdido secuencias propias del brazo 5' del YAC, que no comprometían, en principio, regiones críticas para la correcta expresión del gen *APP*. Por lo tanto, los ratones 3755, 3763 y 3860 se identificaron como los tres posibles fundadores (F0) del nuevo modelo animal de la enfermedad de Alzheimer familiar.

La microinyección del transgén se realiza en el pronúcleo masculino de oocitos fecundados. Sin embargo, en ciertas ocasiones, la integración del transgén en el genoma se produce cuando ya se ha iniciado el mecanismo de segmentación en el cigoto, integrándose en un blastómero, por lo que no todas las células del animal incorporan el transgén, provocando fenómenos de mosaicismo en ratones F0 (Whitelaw et al., 1993). Por lo tanto, la presencia del transgén en los ratones F0 no garantiza su presencia en la línea germinal, condición imprescindible para su utilización posterior, por lo que debía comprobarse su transmisión a las siguientes generaciones (Montoliu, 1997; Giraldo & Montoliu, 2001). Además, pueden haberse producido diferentes integraciones de fragmentos del YAC a lo largo del genoma del ratón, que pueden llevar a la conclusión equivocada, mediante el análisis por técnicas de Biología Molecular, que el ratón contiene la secuencia completa e íntegra del YAC. La verificación de esto se realiza mediante la cosegregación de las veintiocho PCRs analíticas en los F1 transgénicos obtenidos, y así comprobar si mantiene el YAC la integridad estructural.

Para comprobar la transmisión del transgén a la descendencia, se cruzaron los diferentes ratones F0 obtenidos por microinyección (2670, 2673, 3755, 3763 y 3860) con ratones C57BL/6OlaHsd y se analizaron mediante PCR todas las camadas producidas (**Figura R.39**). La transmisión del transgén a la descendencia se produjo en todos los ratones F0, obteniéndose una transmisión en la F1 para el ratón 2670 de un 8%, para el ratón 2673 de un 3.5% (**Tabla R.3**), para el

ratón 3755 de un 29%, para el ratón 3763 de un 25% y para el ratón 3860 de un 70% (**Tabla R.7**). El análisis informático mediante el “test ji-cuadrado” (Montoliu, 2012) permitió concluir que para los ratones 2670, 2673 y 3763 el patrón de herencia no era Mendeliano, y por lo tanto se trataba de ratones F0 mosaicos, mientras que los ratones 3755 y 3860 mostraban el patrón de herencia Mendeliano. Por lo tanto, un 60% de los ratones F0 presentaban mosaicismo tal y como había sido descrito con anterioridad (Whitelaw et al., 1993).

Se realizaron las veintiocho PCRs analíticas en los F1 transgénicos obtenidos de todos los ratones F0, con lo que se pudo observar que todos los ratones F1 fueron positivos para todas las PCRs analizadas. Esto puso de manifiesto que la batería de PCRs diseñada para la comprobación de la integración e integridad estructural del YAC había sido una estrategia adecuada. Adicionalmente se decidió verificar la estructura del YAC mediante *Southern blot* comparativo de los descendientes de los ratones F0, obteniéndose el mismo patrón de bandas (*FingerPrint*) (**Figura R.40**) para todos los ratones analizados junto al clon W4c19 portador del YAC APP^{wt}, lo cual sugería que no se habían producido grandes alteraciones o reordenaciones en el YAC integrado en el genoma de ratón. De este modo se establecieron las diferentes líneas transgénicas: para el modelo de la enfermedad esporádica las líneas Tg2670 y Tg2673 y para el modelo de la enfermedad familiar las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860.

Sin embargo, tal y como se comentará más adelante (apartado 5.4), la expresión del gen *APP* humano resultó muy baja en comparación con el gen *App* murino en las líneas Tg2670, Tg2673 y Tg3763, por lo que se tuvieron que desestimar estas tres líneas para futuros estudios. Todo esto puede ser debido a que la transgénesis llevada a cabo por el método de microinyección provoca la integración al azar del transgén, no pudiéndose garantizar su expresión en el ratón transgénico debido a que se ha observado con frecuencia el fenómeno denominado “variegación por efecto de posición” (PEV, por *Position Effect Variegation*) producido por regiones heterocromáticas, vecinas al punto de integración en el cromosoma, que inhiben la expresión del transgén (Clark et al., 1994; Perrod & Gasser, 2003). En otros casos se ha descrito que la silenciación del transgén es el resultado de procesos de metilación o de heterocromatinización de sus propias secuencias (Iyengar et al., 1996). Tampoco es descartable que el YAC no contenga todos los elementos reguladores necesarios por el locus *APP* para una correcta expresión. Existen casos descritos, como el locus *GATA-3*, en el cual se requirió el uso de un YAC de 625 kb, debido a que no se encontraba una correcta expresión utilizando YACs de 120 y 540 kb (discutido en Giraldo & Montoliu, 2001).

Debido a que ninguna de las líneas transgénicas obtenidas con el YAC APP^wt eran capaces de expresar el transgén a niveles comparables al gen *App* murino, se decidió abordar una nueva estrategia que consistía en la generación de animales transgénicos con este YAC APP^wt mediante el uso de células embrionarias pluripotentes (células ES). Concretamente, se realizó utilizando la técnica de transfección mediada por liposomas en células ES (Lamb et al., 1993; Strauss et al., 1993). El uso de este método conlleva la dificultad intrínseca que supone el trabajo con estas células embrionarias pluripotentes, para lo cual se requirió la colaboración con la Unidad de Transgénesis del Programa de Biotecnología del CNIO, bajo la dirección de la Dra. Sagrario Ortega, en Madrid.

Se decidió abordar esta nueva estrategia de células ES debido a que estudios previos demostraron que con la introducción del YAC APP-8 original se produce expresión del gen *APP* humano en células embrionarias de ratón (Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993), pudiéndose seleccionar de ese modo los clones de células ES más apropiados y prácticamente asegurar la generación de un ratón, con el uso de éstas, capaz de expresar el transgén a niveles comparables a los endógenos del ratón. De esta forma se evitaría continuar con la generación, a través del método de microinyección, de un número considerable de ratones, cuya expresión no estaba asegurada, y su elevado gasto asociado.

Lo primero que se llevó a cabo fue un análisis de transfección en células ES sólo con el plásmido pRV1, el cual se encuentra integrado en el YAC APP^wt, con el fin de analizar la eficiencia en el proceso de selección de clones. Se pudo observar que al utilizar medio suplementado con el antibiótico G418 (el gen *neo* confiere resistencia a geneticina) a 200 µg/ml no se obtenían colonias resistentes, por lo que el promotor de la metalotioneína-I (MT-1) encargado de la expresión del gen *neo* en el plásmido pRV1, no era óptimo para el proceso de selección en células ES. Ante este nuevo imprevisto se decidió realizar una cotransfección en células ES del YAC APP^wt con el vector pPNT (Tybulewicz et al., 1991), que contiene también el gen *neo*, pero controlado por el promotor del gen *Pgk-1* de ratón, el cual presenta una eficiencia mayor en el proceso de selección. Esta cotransfección se llevó a cabo manteniendo la cantidad de ADN de YAC constante y modificando la de vector (500 ng de YAC + 5 ng de vector, 500 ng de YAC + 10 ng de vector, 500 ng + 20 ng de vector y 500 ng de YAC + 40 ng) con el fin de facilitar la cointegración de YAC y vector. Estas cotransfecciones dieron lugar a 225 clones capaces de crecer en medio suplementado con G418 a una concentración de 200 µg/ml. De estos, 12 fueron positivos para al menos una PCR de secuencias propias del YAC, lo que indicaba que se había producido una cointegración en el 5% de los clones de células ES. De estos 12 clones obtenidos, 4 fueron positivos para todas las PCRs analíticas del YAC (**Figura R.43**) y potencialmente positivos para la expresión del transgén.

Tras un análisis de expresión del gen *APP* humano en estos 4 clones de células ES (apartado 4.4.1.1.2.) se decidió utilizar el clon 25 para la generación de embriones quiméricos por medio de la inyección de 5-7 células ES de este clon 25 en el blastocelo de blastocistos de la cepa albina [B6(Cg)-Tyr^{c-2J}/J]. Esta estrategia permitió la identificación de 6 ratones quiméricos (**Figura R.46**) mediante visualización de dos colores en el pelaje debido a que las células ES que se utilizaron en el estudio eran *Bruce4*, y por lo tanto, procedían de una cepa pigmentada (C57BL/6) (Köntgen & Stewart, 1993; Hughes et al., 2007).

En resumen, la estrategia de obtención del ratón con el YAC APP^wt mediante transfección mediada por liposomas en células ES, resultó una estrategia adecuada debido a que mediante dicha técnica se generaron sólo 28 ratones, de los cuales 6 fueron quimeras (21% de eficiencia en la obtención de ratones quiméricos) (**Tabla R.4**), y 2 de esas quimeras, mediante cruces con ratones C57BL/6JOlaHsd, fueron capaces de transmitir el genotipo pigmentado (y con ello poder transmitir también el transgén) a la descendencia (**Tabla R.4**). Además, posteriores análisis de expresión del gen *APP* en los ratones F1 transgénicos obtenidos a partir de las quimeras (apartado 4.4.1.2.6) demostraron que existía expresión de éste a niveles comparables al gen *App* murino permitiendo establecer con ello, finalmente, la línea transgénica Tg25 como posible modelo de la enfermedad de Alzheimer esporádica.

5.4 EXPRESIÓN DEL GEN *APP* HUMANO EN LOS RATONES TRANSGÉNICOS Y CÉLULAS ES

La determinación fenotípica o caracterización de cualquier ratón transgénico debe abordarse, como mínimo, en individuos F1 debido a los fenómenos de mosaicismo, comentados anteriormente (apartado 5.3), en individuos F0, fundadores.

El primer paso para la caracterización de la expresión del gen *APP* humano en el ratón se realizó mediante el análisis de la acumulación de ARNm de *APP*. Estos niveles de expresión del gen *APP* humano se compararon con niveles de expresión del gen *App* murino con el fin determinar una expresión adecuada del transgén en cada línea. Para ello se utilizó la técnica de RT-PCR cuantitativa en placa para poder comparar los niveles en las seis líneas de ratones transgénicos generadas: Tg2670, Tg2673, Tg3755, Tg3763, Tg3860 y Tg25; y en las células ES obtenidas.

En cuanto el análisis en las líneas de ratones transgénicos, se analizó primeramente el ARNm de cerebro de ratón, debido a que es el tejido involucrado en los procesos patológicos de la

enfermedad de Alzheimer, tanto para las líneas establecidas de ratones transgénicos generados mediante microinyección con el YAC APPwt: las líneas Tg2670 y Tg2673; para la línea generada usando el método de lipofección con el YAC APPwt en células ES: la línea Tg25; y para las líneas establecidas de ratones transgénicos generados mediante microinyección con el YAC APPswe: las líneas Tg3755, Tg3763 y Tg3860. El análisis de ratones F1 y F2 de entre dos y cuatro meses de edad reveló que existía una expresión de gen *APP* humano de 0.4% respecto al gen *App* murino para la línea Tg3763, o lo que es lo mismo, existe 1 molécula de ARNm de *APP* humano por cada 250 de *App* murino en el cerebro de estos ratones (**Figura R.55**); de aproximadamente un 2% para las líneas Tg2670 y Tg2673 (1 molécula de ARNm de *APP* humano por cada 50 de *App* murino) (**Figura R.41**), de un 69% en la línea Tg25 (1 molécula de ARNm de *APP* humano por cada 1.45 de *App* murino) (**Figura R.47**), de un 80% para la línea Tg3755 (1 molécula de ARNm de *APP* humano por cada 1.25 de *App* murino) y de un 158% para la línea Tg3860 (1.58 moléculas de *APP* humano por cada 1 de *App* murino) (**Figura R.55**). Los niveles tan bajos de expresión para las líneas Tg2670, Tg2673 y Tg3763, se podrían explicar porque, como se ha descrito en estudios previos, al producirse mediante el método de microinyección la integración al azar del transgén, se puede haber producido esta integración en regiones heterocromáticas que pueden inducir la represión de la expresión del transgén en regiones adyacentes de manera epigenética (Clark et al., 1994; Perrod & Gasser, 2003). A este fenómeno se denomina PEV. Aunque también se han descrito fenómenos de silenciación del transgén mediante procesos de metilación o de heterocromatinización de sus propias secuencias (Iyengar et al., 1996). Sin embargo, las variaciones observadas entre las líneas Tg25, Tg3755 y Tg3860, además de sugerir que podría ser dependiente del sitio de integración del transgén, también podría deberse al número de copias integradas del transgén en cada línea, tal y como se ha descrito con anterioridad (Schedl et al., 1993b) o bien a la falta de regiones reguladoras adicionales (Giraldo & Montoliu, 2001). Las valoraciones llevadas a cabo para establecer el número de copias del transgén (**Figura R.60 y R.61**) reveló que la línea Tg3860 que mostraba los mayores niveles de ARNm de *APP* humano, coincidía en que era la línea que más copias del transgén tenía, que era un total de 7 copias. Sin embargo, se determinó que la línea Tg3755 contenía solamente 1 copia del transgén y mostraba niveles de ARNm de *APP* humano similares a la línea Tg25 que contenía 4 copias de éste. Además, esta línea Tg3755 con sólo 1 copia del transgén mostraba 40 veces más niveles de ARNm de *APP* que las dos líneas que tenían 2 copias del transgén: Tg2670 y Tg2673, y 200 veces más que la línea Tg3763 que contenía también 1 copia del transgén (**Tabla R.8**). En definitiva, estos análisis permitieron concluir que la expresión del transgén era dependiente del sitio de integración de éste (Clark et al., 1994; Perrod & Gasser, 2003) y sugería que podría verse incrementada esta expresión al contener más número de copias del transgén (Schedl et al., 1993b).

Una vez observados los diferentes niveles expresión del gen *APP* humano en el cerebro de las diferentes líneas de ratón, había que confirmar la traducción del ARN a proteína. Para ese estudio, se realizó un análisis mediante *western blot*, con el fin de detectar proteína APP humana en los cerebros de las líneas de ratón que habían sido analizados mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa. Se abordó el estudio utilizando el anticuerpo 6E10, que había sido descrito como específico de la proteína APP humana (Lamb et al., 1993; Venezia et al., 2004). Mediante este análisis se pudo detectar proteína APP humana en los cerebros de los ratones de las líneas Tg25, Tg3755 y Tg3860 (**Figura R.51 y R.58**), y no se llegó a detectar en las líneas Tg2670, Tg2673 y Tg3763 (**Figura R.42 y R.58**), corroborando los resultados obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa. Sólo en aquellos ratones con niveles de ARNm de *APP* humano comparables a niveles de ARNm de *App* murino era posible la detección de proteína APP humana. Un análisis adicional mediante *western blot* con el anticuerpo monoclonal 22c11, que es capaz de reconocer la proteína APP humana y *App* murina (Lamb et al., 1993), permitió valorar la cantidad total de proteína tras su normalización con los valores de α -tubulina. Se comparó el nivel de proteína entre los ratones transgénicos y ratones no transgénicos, obteniéndose que en los ratones transgénicos de la línea Tg25 se encontraban valores de 1.43 (**Figura R.52**), en la línea Tg3755 de 1.51 y en la línea Tg3860 de 2.17 (**Figura R.59**) en relación a los de la proteína detectada en ratones no transgénicos, que era considerado 1 al contener exclusivamente proteína *App* murina. Los únicos ratones analizados, que en el estudio de RT-PCR cuantitativa mostraban bajos niveles de expresión del gen *APP* humano, fueron los de la línea Tg3763, no encontrando diferencias en cuanto a cantidad de proteína al compararlos con ratones no transgénicos (**Figura R.59**).

En la cuantificación de proteína llevada a cabo, hay que tener en cuenta que en los ratones transgénicos se está detectando tanto la proteína humana como la murina, por lo que la cuantificación de dos veces la proteína total, respecto a ratones no transgénicos, supone que está presente la misma cantidad de proteína APP humana y *App* murina. Esto se traduce en que para las líneas Tg25 y Tg3755 la proteína humana se encuentra aproximadamente en cerebro de ratón en cantidades que son la mitad de la proteína *App* murina, y para la línea Tg3860 se encuentra aproximadamente la misma cantidad de proteína humana y murina. Estas diferencias encontradas en cantidad de proteína son similares a los anteriormente descritos, que registran niveles entre 1.7 y 2, aunque medidos solamente en la región de corteza (Buxbaum et al., 1993; Lamb et al., 1993; Murai et al., 1998).

Es importante destacar que, según se ha descrito, la genética de la cepa de ratón utilizada para la generación del ratón transgénico puede influir en la expresión del gen y procesamiento de la proteína (Lehman et al., 2003). De hecho, en estudios realizados con ratones transgénicos que

sobrexpresan la proteína APP mutante, se ha comprobado que la viabilidad del ratón puede estar condicionada por el fondo genético, pudiendo el transgén llegar a ser letal para algunas cepas determinadas de ratón (Hsiao et al., 1995; 1996).

A este respecto, debe tenerse en cuenta que los ratones fundadores generados mediante microinyección, al ser oocitos procedentes de un cruce de ratones F1 B6CBA contienen aproximadamente un 50% de fondo genético C57BL/6J, por lo que al haber realizado retrocruzamientos con ratones C57BL/6J, la F1 tiene un 75 % de este fondo genético y la F2 tiene un 87.5 %. Por lo tanto, los niveles de expresión deberán ser analizados en estudios siguientes para su correcta caracterización cuando la cepa de ratón se considere consanguínea (F9 → 99,9% fondo genético C57BL/6J).

Sin embargo, la línea de ratón Tg25, al haberse generado mediante el uso de células ES *Bruce4*, el genotipo se considera consanguíneo desde la F1 obtenida por derivar el genotipo de C57BL/6 (Köntgen & Stewart, 1993), aunque al haberse observado cierta variación genética al compararla con C57BL/6 (Hughes et al., 2007), se mantendrá en retrocruzamiento con ratones C57BL/6JOlaHsd para realizar el análisis posterior junto a los ratones procedentes de la generación por microinyección.

El ensayo conjunto de las técnicas RT-PCR cuantitativa y *western blot* permitieron descartar las líneas Tg2670, Tg2673 y Tg3763 para futuros ensayos de caracterización fenotípica del ratón al confirmarse niveles tan bajos de expresión del transgén, y permitieron el establecimiento de la línea Tg25, capaz de expresar el gen APP humano en su variedad silvestre con niveles de expresión similares a los de *App* murino, y de las dos líneas Tg3755 y Tg3860 como líneas capaces de expresar el gen *APP* humano con la mutación “Sueca” con niveles de expresión similares a los del gen *App* murino.

De acuerdo con las referencias existentes, la expresión del gen *APP* se da en numerosos tejidos (Schmechel et al., 1988) pero es en cerebro donde estos niveles son mayores (Kang et al., 1987; Robakis et al., 1987b; Tanzi et al., 1987; Neve et al., 1988). En el presente estudio, tal y como puede comprobarse en las **Figuras R.48 y R.56**, se decidió abordar el estudio de los niveles de expresión en diferentes regiones del SNC. Para ello se hicieron cuatro divisiones del cerebro (apartado 3.6.2.1.) y se analizaron junto a la médula espinal. Se analizaron las líneas que expresaban el gen *APP* humano en cerebro a niveles comparables al gen *App* murino: Tg25, la línea que expresaba el gen *APP* humano en su variante silvestre y Tg3755 y Tg3860, las líneas que expresaban

el gen APP humano con la mutación “Sueca”. Se puede observar que los niveles son mayores en la corteza, y los altos niveles de expresión del gen en la médula espinal se pueden explicar porque es parte del SNC y, por ende, está compuesta por tejido nervioso, lugar donde se encuentran las principales líneas celulares productoras de proteína APP, los astrocitos (Tanaka et al., 1988; LeBlanc et al., 1991; Gray & Patel, 1993; Shioi et al., 1995). Por otro lado, en ninguno de los estudios publicados con el YAC APP-8 se hace referencia a un examen exhaustivo de los tejidos de los ratones transgénicos para comprobar la expresión del gen APP humano. De hecho, sólo un grupo informa de haber estudiado su expresión fuera del tejido nervioso, concretamente en corazón, riñón y testículo (Lamb et al., 1993; Lamb et al., 1997). En esta investigación, cuyos resultados se discuten aquí, se decidió también abordar el estudio de los niveles de expresión en los principales órganos de los ratones obtenidos en la línea Tg25, Tg3755 y Tg3860. Los resultados de estos análisis, que se presentan en la **Figura R.49 y R.57**, pusieron de manifiesto la expresión del gen *APP* humano en los órganos corazón, riñón y testículo, detectándose niveles más altos para estos dos últimos que para el corazón; aunque todos ellos se encuentran muy por debajo de los registros de cerebro; resultados que son, en gran medida, similares a los obtenidos por el Dr. Bruce T. Lamb (Lamb et al., 1993). Además, los resultados muestran que existe expresión del gen *APP* humano en otros órganos como el pulmón, estómago, hígado, bazo e intestino, aunque muy bajos para estos tres últimos órganos (**Figura R.49 y R.57**).

La expresión en los distintos órganos del gen *APP* humano resulta en gran medida similar a la del gen *App* murino, conservándose el patrón de expresión en el tejido nervioso (**Figuras R.48 y R.56**), así como en pulmón, riñón y testículo (**Figura R.49 y R.57**). Sin embargo, se detecta la expresión del gen *App* murino en corazón, hígado, bazo, estómago e intestino, aunque con valores muy inferiores a los otros órganos, y que no mantienen el patrón de expresión con el gen *APP* humano (**Figura R.49 y R.57**). Estos resultados se podrían deber a que niveles tan bajos de expresión, mediante esta técnica de RT-PCR, podrían conducir a una variabilidad muy alta de los resultados obtenidos, de tal forma que la cuantificación no se hace fiable.

Para concluir los estudios de expresión del gen *APP* humano en ratones transgénicos, se decidió realizar un análisis por RT-PCR del *splicing* alternativo de los tres principales transcritos de *APP* humano y *App* murino: 770, 751 y 695 (**Figura R.50A**). Estudios previos observaron la relación entre los tres ARNm en la corteza frontal humana y vieron que era la siguiente: 770:751:695; 5:37:58 (% del total), mientras que en cerebro de ratón la proporción es muy distinta y corresponde a: 770:751:695, 3:3:94 (% del total) (Rockenstein et al., 1995). El experimento llevado a cabo en la presente investigación, aunque no se trata de un método cuantitativo, sí demostró que el transcrito de

ratón mayoritario en corteza, y en general en todo el SNC, se correspondía al transcrito 695, siendo prácticamente indetectables el 751 y 770. Sin embargo, en el estudio de los transcritos humanos, se observó que la mayoritaria en SNC era también el 695, pero se detectaba, de manera notable, el 751 (**Figura R.50B**), resultados que se corresponden con los citados anteriormente (Rockenstein et al., 1995) y demuestran que la isoforma mayoritaria en cerebro, en ambos casos, es la isoforma 695 (Tanaka et al., 1989). También se hizo un estudio de estos tres transcritos en los principales órganos de los ratones transgénicos (**Figura R.50C**), lo que permitió observar que los transcritos humanos variaban en función del tejido analizado. Así, en órganos como hígado, riñón y pulmón se detectaban los transcritos 770 y 751, en corazón, estómago y testículo se detectaban los tres transcritos, y en intestino y bazo se detectaba únicamente el transcrito 695. Sin embargo, al analizar los transcritos propios del *App* de ratón, se pudo observar que en todos los órganos, excepto en cerebro, intestino y bazo, se detectaban los tres transcritos, mientras que en cerebro era el 695, en intestino el 770 y en bazo el 751. Un análisis del mismo tipo, llevado a cabo en ratones con el YAC APP-8, mostraron resultados muy similares en los órganos analizados, que eran corazón, riñón y testículo (Lamb et al., 1993).

Este estudio de los diferentes transcritos permitió concluir que, gracias a que el gen *APP* humano, introducido en el genoma de ratón, contiene la secuencia completa de su locus, es capaz de mimetizar en ratones el mecanismo de *splicing* alternativo tejido-dependiente propio de humanos, de tal forma que los futuros estudios en el ratón, de los mecanismos moleculares que suceden en procesos propios de la EA, permitirían sobre dicho modelo reflejar situaciones más cercanas a la realidad que se da en los paciente humanos.

Los resultados de esta investigación en lo referente a la expresión del gen *APP* humano en ratones son, por tanto, plenamente concordantes con los descritos en ratones transgénicos que portan construcciones similares, en los que es en el cerebro donde se encuentran los mayores niveles de ARNm (Buxbaum et al., 1993; Lamb et al., 1993; Pearson and Choi, 1993; Lamb et al., 1997).

Por otro lado indicar que el descarte de las líneas establecidas por microinyección con el YAC APP*wt* condujo a la generación de ratones transgénicos utilizando el método de transfección mediada por liposomas, conteniendo en su interior el ADN del YAC APP*wt*, en células ES (apartado 5.3), lo que condujo finalmente a la creación de la línea transgénica Tg25 que se ha nombrado en estos estudios de expresión del gen *APP* humano. El nombre de esta línea transgénica procede del clon de células ES que se decidió seleccionar para la generación de ratones quiméricos. Se realizó un análisis de expresión del gen *APP* humano en 4 clones de células ES y para ello se extrajo el ARNm de estos 4

clones. De nuevo, mediante RT-PCR cuantitativa en placa, se midieron los niveles de ARNm de *APP* humano y *App* murino y tras este análisis se pudo observar que para el clon ES 7 no se detectaba ningún tipo de expresión del gen *APP* humano, para el clon ES 100 existía una expresión de aproximadamente un 0.5% del gen *APP* humano respecto al gen *App* murino (1 molécula de ARNm de *APP* humano por cada 200 de *App* murino), para el clon ES 86 de 29% (1 molécula de *APP* humano por cada 3.5 de *App* murino) y para el clon ES 25 de 355% (3.5 moléculas de *APP* humano por cada 1 de *App* murino) (**Figura R.44**). El no detectar ningún tipo de expresión en el clon ES 7 y niveles tan bajos en el clon ES 100, sugería que la expresión del transgén en estas células ES, al igual que sucediera con las líneas de ratones, era dependiente del sitio de integración del transgén, ya que este método también produce una integración al azar del transgén. Comparando los niveles de expresión del gen *APP* humano en los clones ES 86 y ES 25, se pudo observar que, además de la posible dependencia en el sitio de integración, niveles más altos de expresión del gen *APP* humano respecto al gen *App* murino en el clon ES 25 podrían ser explicados por la integración de un mayor número de copias del transgén, tal y como se ha descrito con anterioridad (Schedl et al., 1993b). Se decidió, como se ha mencionado anteriormente, la selección de este clon ES 25, por ser el clon que generaba mayores niveles de expresión del gen *APP* humano y una mayor acumulación de proteína *APP* humana (**Figura R.45**), para la generación de ratones quiméricos que como último resultado permitió el establecimiento de la línea Tg25 que contenía el gen *APP* en su variante silvestre.

5.5 VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS MODELOS GENERADOS

A principios de los años 90 se descubrieron mutaciones en el gen *APP* (Goate et al., 1991; Mullan et al., 1992) y en los genes *PS* (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995) en familias que padecían enfermedad de Alzheimer de aparición temprana. Debido a que las *PS1* y *PS2* codifican para las proteínas encargadas del procesamiento de la propia proteína *APP*, estos hallazgos sugerían que, de alguna manera, la proteína *APP* jugaba un papel importante en el desarrollo de la EA. Esto, junto a los avances obtenidos en la tecnología de transgénesis, condujo a la generación de modelos animales transgénicos para su estudio. La generación de prácticamente todos estos modelos se ha basado en la introducción de construcciones de ADNc que codifican para diferentes isoformas de *APP* y que se encuentran bajo el control de diferentes promotores, que conducen, finalmente, a la sobreexpresión entre 5 y 10 veces del gen *APP*. Además, la amplia mayoría de estos modelos presentan diferentes mutaciones en el gen *APP* ligadas a la EAF (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997; Mucke et al., 2000; Chishti et al., 2001), con lo que se consigue aumentar la cantidad de péptido A β humano en el ratón. Se han generado también ratones dobles

transgénicos con mutaciones, además de en el gen *APP* (Borchelt et al., 1997; Lee et al., 1997; Holcomb et al., 1998; Howlett et al., 2004), en genes *PS*, que han llegado a producir un aumento entre 5 y 12 veces de péptido A β . Y se han llegado a generar, incluso, ratones triples transgénicos que presentaban mutaciones en el gen *APP*, *PS* y *TAU* (Oddo et al., 2003a), con lo que se ha conseguido el desarrollo conjunto, en el cerebro de ratón, de las dos marcas histopatológicas características de la EA: las placas seniles (péptido A β) y los ovillos neurofibrilares (proteína TAU hiperfosforilada).

En los diferentes modelos que se han mencionado se ha descrito la aparición de placas amiloides en los cerebros de los ratones, ocupando entre el 20 y 50 % de las regiones del cerebro (Selkoe, 1991; Irizarry et al., 1997a), mientras que en los enfermos humanos la presencia de placas no supera el 12 % (Hyman et al., 1993; Mufson et al., 1999). Además, a pesar de las grandes cantidades de placas observadas en estos modelos, no se ha llegado a describir en ellos procesos de neurodegeneración. En ciertos modelos, la sobreexpresión de la proteína mutante ha provocado alteraciones en el desarrollo de los cerebros de los ratones, como la atrofia progresiva observada en el modelo PDAPP durante los 3 primeros meses de vida (Dodart et al., 1999; Redwine et al., 2003), o la gliogénesis aberrante en el modelo TgAPP23 (Bondolfi et al., 2002), demostrando así el papel de la proteína en el desarrollo cerebral (Trapp & Hauer, 1994) y la importancia de la correcta expresión de la misma.

En cuanto a los análisis conductuales llevados a cabo en estos modelos, se ha observado que la aparición de los déficits cognitivos precedía a la aparición de placas amiloides (Chapman et al., 1999; King et al., 1999; Koistinaho et al., 2001; Westerman et al., 2002), lo que podía ser debido a un problema en el desarrollo del sistema nervioso y no a la acumulación de placas amiloides, o bien por la presencia de formas solubles de A β (Hardy & Selkoe, 2002).

En resumen, prácticamente en todos los modelos se ha podido inducir patología amiloide, lo que ha permitido comprender gran parte de los mecanismos moleculares propios de procesos patológicos de la EA, permitiendo evaluar el proceso de formación de placas amiloides en áreas límbicas y corticales de ratón, de forma similar a lo que ocurre en humanos, así como los cambios que producen en la pérdida de las capacidades cognitivas de los mismos. Sin embargo, estos modelos sufren una serie de limitaciones debido a que no han sido capaces de generar todas las patologías de la EA (Seabrook & Rosahl, 1999; Janus & Westaway, 2001). La mayoría de los ratones transgénicos generados reproducen las características de EA vinculadas a la presencia de mutaciones humanas que inducen la infrecuente forma familiar de la EA, representando sólo el 1% de los todos los casos de EA, en lugar de la forma más prevalente de la enfermedad, la esporádica, que a pesar de que es

indistinguible de la EAF en términos de fenotipo patológico, no involucra a las mutaciones genéticas. Por lo tanto, los ratones transgénicos generados se encuentran más cerca de reproducir lo que ocurre en la EAF, estando pendiente de descubrir los factores que conducen a la acumulación de A β y agregación en la EAE. Además, la presencia de hasta tres mutaciones simultáneas en genes, necesarias para inducir en ratón gran parte de los procesos patológicos de la EA, es una situación que no refleja plenamente la situación humana, ya que nunca han sido descritas estas tres mutaciones simultáneas en humanos, lo que podría conducir a un proceso artificial en los modelos generados. Otro aspecto a destacar es que para formar placas amiloides en ratón es necesaria la sobreexpresión del gen *APP* humano entre 5 y 10 veces, cuando en humanos un aumento del 50% (x 1.5 veces) en la expresión del gen *APP* es suficiente para desarrollar placas, como ocurre, por ejemplo en el síndrome de Down debido a la trisomía del cromosoma 21 (Duff & Suleman, 2004).

En 1993, tres grupos publicaron, casi de forma simultánea, la generación de un ratón transgénico con un mismo YAC de 650 kb (clon B142F9 *Washington University YAC library*), el cual incluía la secuencia completa del gen *APP* (Buxbaum et al., 1993; Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993). En estos ratones se consiguió una expresión en cerebro del gen *APP* humano similar al *App* endógeno de ratón, sin observarse la formación de placas o cambios neuropatológicos relevantes. Los test de comportamiento realizados a estos ratones revelaron que no había diferencias en el aprendizaje con sus hermanos de camada (Murai et al., 1998). Posteriormente, en 1997, se introdujo la mutación “Sueca” y la “Londinense” (K670N/M671L + V717I), asociadas a la EAF, en este YAC *APP* procedente del clon B142F9, y se generaron ratones transgénicos con esta construcción, en los cuales se observaba una mayor cantidad del péptido A β 40 y A β 42, tanto en sangre como en suero, pero sin la existencia de placas (Lamb et al., 1997). La secuenciación del genoma humano (Pennisi, 2000; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) reveló que el YAC utilizado para la generación de estos ratones, además del gen *APP*, contenía el gen que codifica para el factor de transcripción GABPA, lo que podía generar un fenotipo indeseado o interferir en la expresión del gen *APP* (Lamb et al., 1997).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, se planteó el objetivo principal de este trabajo: la generación de dos nuevos modelos de ratones transgénicos. El primer modelo portador del locus completo del gen *APP* humano en su variante silvestre (*APP*^{wt}), evitando su sobreexpresión, sobre el cual debería estudiarse la posible implicación de los factores considerados de riesgo para el desarrollo de la EAE (envejecimiento, estrés oxidativo, infecciones, etc.) como paso imprescindible para lograr la comprensión de su etiología y, finalmente, el desarrollo de una terapia para combatirla. El segundo modelo portador del locus completo del gen *APP* humano que contenga la mutación “Sueca” (*APP*^{swe}) asociada a la EAF, de tal forma que pueda analizarse de forma conjunta con el primer

modelo para tratar de esclarecer los mecanismos responsables derivados de los dos tipos de EA. Ambos modelos se decidieron generar a partir del YAC utilizado en los estudios previos (Buxbaum et al., 1993; Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993) con la diferencia de que dicho YAC debería modificarse para la eliminación del gen *GABPA* con el fin de que éste no pudiera interferir en la expresión del gen *APP* en los nuevo ratones, ni generar un fenotipo indeseado (Lamb et al., 1997).

En los dos modelos generados en este trabajo, tanto el ratón que expresa la variante silvestre del gen *APP* humano, como el que expresa la variante con la mutación “Sueca”, se ha conseguido una expresión del gen *APP* comparables a los niveles de expresión del gen *App* endógeno de ratón, tal y como se había descrito en los trabajos anteriores con el YAC original (Buxbaum et al., 1993; Lamb et al., 1993; Pearson & Choi, 1993) y con el YAC mutado (Lamb et al., 1997) con la diferencia de que en los ratones generados en este estudio se ha conseguido eliminar el gen *GABPA* presente en los modelos generados previamente. La generación de estos dos nuevos modelos de ratones transgénicos supone el comienzo de una serie de experimentos. En primer lugar, los ratones deberán retrocruzarse hasta conseguir un fondo genético C57BL/6J consanguíneo con el fin de realizar futuros ensayos conductuales y valorar posibles déficits cognitivos en los nuevos modelos. La elección de esta cepa consanguínea se debe, además de porque el primer genoma de ratón secuenciado correspondía a esta cepa (Waterston et al., 2002), a que ha sido la cepa elegida en prácticamente todos los modelos generados para el estudio de la EA, y por lo tanto, estos análisis conductuales futuros permitirán una comparación con los anteriores modelos con el fin de valorar qué cambios podrían ser atribuibles a la nueva construcción. Además, se ha podido comprobar que al utilizar determinadas cepas de ratón con construcciones que portan el gen *APP* humano mutado, pueden presentarse cambios fenotípicos importantes (Carlson et al., 1997) como por ejemplo en la cepa FVB/N, que la introducción del gen *APP* humano mutado es letal para dicha cepa (Hsiao et al., 1995); al igual que se ha descrito que diferentes fondos genéticos de ratón podrían alterar el metabolismo y el depósito de A β (Lehman et al., 2003).

El siguiente paso que se debería llevar a cabo es cruzar ambos modelos generados con el ratón transgénico *knock-out* para el gen *App* murino (Zheng et al., 1996), generando de esta forma un ratón transgénico que fuera capaz de expresar únicamente la proteína APP humana en su variante silvestre y un ratón que fuera capaz de expresar únicamente la proteína APP humana con la mutación “Sueca”. La coexistencia de ambas proteínas, humana y murina, es algo que no existe, como es lógico, en pacientes humanos; por lo que la eliminación de la forma murina en ratones transgénicos se hace necesaria si se quiere tratar de mimetizar la EA en estos modelos. Se ha visto que el A β murino por sí solo es incapaz de formar placas (Cork et al., 1988; Jucker et al., 1992) por las diferencias en su

secuencia con el humano (Bush et al., 1994), pero sí se ha descrito que el A β murino es capaz de coagregarse cuando está presente el A β humano y formar placas, las cuales contienen diez veces más niveles de A β 42 murino que A β 40 humano (Pype et al., 2003).

El siguiente aspecto a tener en cuenta consiste en que la integración de los YACs en el genoma de los dos modelos generados, se dan a nivel de un único cromosoma, de tal forma que el ratón es hemicigótico para el transgén. Teniendo en cuenta esto, se deberían cruzar dos ratones hemicigóticos para el YAC APP wt entre sí hasta conseguir un modelo animal que contuviera en homocigosis el gen *APP* humano en su variante silvestre, y un ratón hemicigótico para el YAC APP wt con un ratón hemicigótico para el YAC APP swe , de tal forma que contuviera la variante silvestre y la variante con la mutación “Sueca” debido a que son las situaciones que se encuentran en la población humana, que no se han explorado aún en un modelo de ratón, y que permitirían un análisis conjunto con el fin de dilucidar los aspectos responsable de la EAE y EAF.

En cuanto a los dos modelos a analizar, la expresión del gen *APP* humano con la mutación “Sueca” en el ratón y, en consecuencia final, la generación del péptido A β humano, deberían hacer posible que en el modelo, debido a este componente genético, se puedan formar placas amiloides sin necesidad de aplicar otros estímulos. Por otro lado, la aplicación, sobre el modelo que expresa el gen *APP* humano en su variante silvestre, de distintos factores ambientales como son traumatismos craneoencefálicos severos (Graves et al., 1990; Molgaard et al., 1990; Jellinger, 2004), infecciones con ciertos patógenos (Itzhaki y col., 1997), neuroinflamación (Holmes et al., 2009; McGeer & McGeer, 2001) considerados responsables en gran medida de la variante esporádica de la enfermedad; o la implicación de factores de riesgo genético [cruces con ratones humanizados para APOE- ϵ 4 (Raber et al., 1998)] podrían conducir también a la formación de placas amiloides, lo que haría de ambos modelos una herramienta muy importante para el estudio de la EAE y EAF.

Todos estos experimentos se abordarán en etapas posteriores. Se espera que los ratones generados en esta Tesis Doctoral contribuyan a dilucidar la etiología y desarrollo de la EAE y EAF. Con un mayor conocimiento de cómo se establece esta patología neurodegenerativa debería ser posible desarrollar nuevos métodos preventivos, paliativos o curativos de sus síntomas asociados.



6 CONCLUSIONES

1999. Autorretrato borrado de William Utermohlen

Galería Beckel Odille Boïcos, París

A partir de 1998, William experimentó una gran dificultad en el manejo de las pinturas al óleo. En este autorretrato, sus rasgos se han tachado y repintado constantemente por el artista en un posible acto de frustración.

- 1) Se ha podido determinar la secuencia de ADN exacta que contiene el YAC APP-8 (610570 pb), portador del locus *APP* humano, utilizado como material de partida en esta tesis doctoral. Este YAC, conocido desde 1993, no había sido descrito en detalle anteriormente.
- 2) Se ha eliminado la secuencia del gen *GABPA* incluido dentro del YAC APP-8, generándose el YAC APPwt, con objeto de prevenir posibles interferencias en el fenotipo de los ratones transgénicos resultantes de la generación de animales transgénicos con este YAC, asociado a EAE.
- 3) A partir del YAC APPwt, portador del locus *APP* humano y carente del gen *GABPA*, se ha obtenido una variante mutante que contiene la mutación “Sueca” (K670N/M671L), asociada a EAF, utilizando el procedimiento *Pop-in/Pop-out* de recombinación homóloga en levaduras.
- 4) Se han generado 3 líneas de ratones transgénicos con el YAC APPwt y 3 líneas de ratones transgénicos con el YAC APPswe utilizando dos metodologías (5 líneas obtenidas por microinyección en oocitos fecundados y 1 línea por lipofección de células ES y obtención posterior de ratones transgénicos a partir de los ratones quiméricos resultantes).
- 5) El análisis de todas las líneas de ratones transgénicos generadas ha permitido determinar que existe expresión del transgén *APP* humano similar al locus *App* murino en la línea Tg25 de APPwt y en las líneas Tg3755 y Tg3860 de APPswe.
- 6) La distribución de isoformas *APP* humanas, derivadas del transgén APPwt y APPswe, sigue un patrón similar al conocido para el locus *APP* humano y distinto del locus *App* murino, lo cual indica que se ha conseguido restituir la expresión correcta del locus *APP* humano en estos ratones, sin la aparición de fenómenos de sobreexpresión artificial, documentada en modelos animales anteriores de EA, y en ausencia por vez primera del gen *GABPA*.
- 7) Se ha confirmado la presencia de proteína APPwt y APPswe en las líneas de ratones transgénicos con la expresión correcta del transgén, en concentración similar a la proteína *App* endógena.

Conclusión final

Esta tesis doctoral ha permitido obtener diversas líneas de ratones transgénicos *APPwt* y *APPswe* con una expresión normal del locus *APP*, similar a la endógena, que ahora podrán ser objeto de múltiples análisis adicionales encaminados a demostrar su validez como modelo animal de EAE y EAF.



7 BIBLIOGRAFÍA

2000. Cabeza

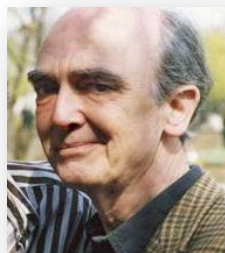
Galería Beckel Odille Boïcos, Paris

Cinco años más tarde del diagnóstico, William realizó su último retrato. Fue realizado a lápiz sobre papel. El autorretrato muestra el deterioro de la cognición del pintor hacia su persona a medida que los años avanzan debido al progreso de la enfermedad de Alzheimer. Del primer retrato realizado una vez diagnosticado de la enfermedad en el año 1995, donde el pintor tiene plena capacidad y conciencia de sus gestos, facciones y semblante, llegamos al último autorretrato donde las facciones se han ido desdibujando y sólo queda un esbozo de cara partida en dos mitades por una línea que quiere bosquejar una nariz incompleta en un rostro carente de ojos, sin expresión y desdibujado en una maraña de líneas negras y sombras.

Estos autorretratos, dictados por la enfermedad, nos sirven de espejo para saber cómo actúa ésta en la percepción que el cerebro posee de las cosas cuando el mal de Alzheimer avanza en cada una de sus fases. Uno de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer son estas agnosias, definidas como un fallo en el reconocimiento o identificación de objetos, a pesar de que la función sensorial está intacta, llegando incluso a no reconocer rostros de sus familiares, lo que se denomina prosopagnosias.

Estas pinturas son fiel reflejo de lo que la enfermedad hace con lo que rodea a la persona que la sufre, pues igual que las facciones de los retratos y su percepción por el pintor se desdibuja con el paso del tiempo, también se desdibujan las palabras, los afectos, las personas y demás conocimientos almacenados en el cerebro, creando así las dificultades propias de este mal, igual que el pintor muestra dichas dificultades para poder dibujar su propio rostro.

William Utermohlen falleció en el año 2007 a causa de las complicaciones derivadas de su enfermedad.



- Abraham, C. R., Selkoe, D. J., and Potter, H. (1988). "Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease." *Cell*, 52(4), 487-501.
- Adams, A. G., D.E.; Kaiser, C.; Stearns, T. (1997). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ainscough, J. F., Koide, T., Tada, M., Barton, S., and Surani, M. A. (1997). "Imprinting of Igf2 and H19 from a 130 kb YAC transgene." *Development*, 124(18), 3621-32.
- Aisen, P. S. (2002). "The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease." *Lancet Neurol*, 1(5), 279-84.
- Aldudo, J., Bullido, M. J., Arbizu, T., Oliva, R., and Valdivieso, F. (1998). "Identification of a novel mutation (Leu282Arg) of the human presenilin 1 gene in Alzheimer's disease." *Neurosci Lett*, 240(3), 174-6.
- Alvarez, G., Aldudo, J., Alonso, M., Santana, S., and Valdivieso, F. (2012). "Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated tau in neuronal cells." *J Neurosci Res*, 90(5), 1020-9.
- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allg Z Psychiat Psych Gericht Med*, 64, 146-148.
- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." *J Neurosci Res*, 74(3), 342-52.
- Andersen, K., Launer, L. J., Dewey, M. E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., Lobo, A., Martinez-Lage, J. M., Stijnen, T., and Hofman, A. (1999). "Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group." *Neurology*, 53(9), 1992-7.
- Arelin, K., Kinoshita, A., Whelan, C. M., Irizarry, M. C., Rebeck, G. W., Strickland, D. K., and Hyman, B. T. (2002). "LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes." *Brain Res Mol Brain Res*, 104(1), 38-46.
- Arendash, G. W., and King, D. L. (2002). "Intra- and intertask relationships in a behavioral test battery given to Tg2576 transgenic mice and controls." *Physiol Behav*, 75(5), 643-52.
- Arnold, S. E., Hyman, B. T., Flory, J., Damasio, A. R., and Van Hoesen, G. W. (1991). "The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease." *Cereb Cortex*, 1(1), 103-16.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., and Hyman, B. T. (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." *Neurology*, 42(3 Pt 1), 631-9.
- Artiga, M. J., Bullido, M. J., Frank, A., Sastre, I., Recuero, M., Garcia, M. A., Lendon, C. L., Han, S. W., Morris, J. C., Vazquez, J., Goate, A., and Valdivieso, F. (1998). "Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene." *Hum Mol Genet*, 7(12), 1887-92.
- Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003). "Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase." *Biochem Biophys Res Commun*, 301(1), 231-5.
- Auerbach, A. B., Norinsky, R., Ho, W., Losos, K., Guo, Q., Chatterjee, S., and Joyner, A. L. (2003). "Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production." *Transgenic Res*, 12(1), 59-69.
- Ausubel FM, B. R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl, K. (1999). *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley and sons.
- Balducci, C., Beeg, M., Stravalaci, M., Bastone, A., Scip, A., Biasini, E., Tapella, L., Colombo, L., Manzoni, C., Borsello, T., Chiesa, R., Gobbi, M., Salmona, M., and Forloni, G. (2010a). "Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(5), 2295-300.

- Balducci, C., and Forloni, G. (2011). "APP transgenic mice: their use and limitations." *Neuromolecular Med*, 13(2), 117-37.
- Balducci, C., Tonini, R., Zianni, E., Nazzaro, C., Fiordaliso, F., Salio, M., Vismara, L., Gardoni, F., Di Luca, M., Carli, M., and Forloni, G. (2010b). "Cognitive deficits associated with alteration of synaptic metaplasticity precede plaque deposition in AbetaPP23 transgenic mice." *J Alzheimers Dis*, 21(4), 1367-81.
- Bales, K. R. (2012). "The value and limitations of transgenic mouse models used in drug discovery for Alzheimer's disease: an update." *Expert Opin Drug Discov*, 7(4), 281-97.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011). "Alzheimer's disease." *Lancet*, 377(9770), 1019-31.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Wisniewski, H. M. (1989). "Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." *Brain Res*, 477(1-2), 90-9.
- Barnett, K. R., Tomic, D., Gupta, R. K., Miller, K. P., Meachum, S., Paulose, T., and Flaws, J. A. (2007). "The aryl hydrocarbon receptor affects mouse ovarian follicle growth via mechanisms involving estradiol regulation and responsiveness." *Biol Reprod*, 76(6), 1062-70.
- Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A., and Hilger, F. (1991). "The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast*, 7(5), 475-7.
- Bertram, L., and Tanzi, R. E. (2004). "Alzheimer's disease: one disorder, too many genes?" *Hum Mol Genet*, 13 Spec No 1, R135-41.
- Blacker, D., Wilcox, M. A., Laird, N. M., Rodes, L., Horvath, S. M., Go, R. C., Perry, R., Watson, B., Jr., Bassett, S. S., McInnis, M. G., Albert, M. S., Hyman, B. T., and Tanzi, R. E. (1998). "Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease." *Nat Genet*, 19(4), 357-60.
- Blennow, K., de Leon, M. J., and Zetterberg, H. (2006). "Alzheimer's disease." *Lancet*, 368(9533), 387-403.
- Blennow, K., and Zetterberg, H. (2009). "Use of CSF biomarkers in Alzheimer's disease clinical trials." *J Nutr Health Aging*, 13(4), 358-61.
- Boncrisiano, S., Calhoun, M. E., Howard, V., Bondolfi, L., Kaeser, S. A., Wiederhold, K. H., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (2005). "Neocortical synaptic bouton number is maintained despite robust amyloid deposition in APP23 transgenic mice." *Neurobiol Aging*, 26(5), 607-13.
- Bondolfi, L., Calhoun, M., Ermini, F., Kuhn, H. G., Wiederhold, K. H., Walker, L., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (2002). "Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice." *J Neurosci*, 22(2), 515-22.
- Bonifer, C. (2000). "Developmental regulation of eukaryotic gene loci: which cis-regulatory information is required?" *Trends Genet*, 16(7), 310-5.
- Borchelt, D. R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1997). "Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins." *Neuron*, 19(4), 939-45.
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G., and Sisodia, S. S. (1996). "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo." *Neuron*, 17(5), 1005-13.
- Botstein, D., and Fink, G. R. (1988). "Yeast: an experimental organism for modern biology." *Science*, 240(4858), 1439-43.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." *Acta Neuropathol*, 82(4), 239-59.

- Brouwers, N., Sleegers, K., and Van Broeckhoven, C. (2008). "Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update." *Ann Med*, 40(8), 562-83.
- Bullido, M. J., Aldudo, J., Frank, A., Coria, F., Avila, J., and Valdivieso, F. (2000). "A polymorphism in the tau gene associated with risk for Alzheimer's disease." *Neurosci Lett*, 278(1-2), 49-52.
- Bullido, M. J., Artiga, M. J., Recuero, M., Sastre, I., Garcia, M. A., Aldudo, J., London, C., Han, S. W., Morris, J. C., Frank, A., Vazquez, J., Goate, A., and Valdivieso, F. (1998). "A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia." *Nat Genet*, 18(1), 69-71.
- Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M. J., and Valdivieso, F. (2002). "Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system." *J Virol*, 76(23), 12394-8.
- Burke, D. T., Carle, G. F., and Olson, M. V. (1987). "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors." *Science*, 236(4803), 806-12.
- Burke, D. T., Carle, G. F., and Olson, M. V. (1992). "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. 1987." *Biotechnology*, 24, 172-8.
- Burke, D. T., and Olson, M. V. (1991). "Preparation of clone libraries in yeast artificial-chromosome vectors." *Methods Enzymol*, 194, 251-70.
- Busciglio, J., Hartmann, H., Lorenzo, A., Wong, C., Baumann, K., Sommer, B., Staufenbiel, M., and Yankner, B. A. (1997). "Neuronal localization of presenilin-1 and association with amyloid plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." *J Neurosci*, 17(13), 5101-7.
- Bush, A. I., Pettingell, W. H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Tanzi, R. E. (1994). "Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc." *Science*, 265(5177), 1464-7.
- Buxbaum, J. D., Christensen, J. L., Ruefli, A. A., Greengard, P., and Loring, J. F. (1993). "Expression of APP in brains of transgenic mice containing the entire human APP gene." *Biochem Biophys Res Commun*, 197(2), 639-45.
- Calhoun, M. E., Wiederhold, K. H., Abramowski, D., Phinney, A. L., Probst, A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., and Jucker, M. (1998). "Neuron loss in APP transgenic mice." *Nature*, 395(6704), 755-6.
- Calon, F., and Cole, G. (2007). "Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77(5-6), 287-93.
- Carlson, G. A., Borchelt, D. R., Dake, A., Turner, S., Danielson, V., Coffin, J. D., Eckman, C., Meiners, J., Nilsen, S. P., Younkin, S. G., and Hsiao, K. K. (1997). "Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice." *Hum Mol Genet*, 6(11), 1951-9.
- Carstea, A. C., Pirtly, M. K., and Dinnyes, A. (2009). "Germline competence of mouse ES and iPS cell lines: Chimera technologies and genetic background." *World J Stem Cells*, 1(1), 22-9.
- Cemal, C. K., Huxley, C., and Chamberlain, S. (1999). "Insertion of expanded CAG trinucleotide repeat motifs into a yeast artificial chromosome containing the human Machado-Joseph disease gene." *Gene*, 236(1), 53-61.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., and Selkoe, D. J. (1997). "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice." *Nat Med*, 3(1), 67-72.
- Clark, A. J., Bissinger, P., Bullock, D. W., Damak, S., Wallace, R., Whitelaw, C. B., and Yull, F. (1994). "Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression." *Reprod Fertil Dev*, 6(5), 589-98.

- Clark, M. J., Gagnon, J., Williams, A. F., and Barclay, A. N. (1985). "MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain." *EMBO J*, 4(1), 113-8.
- Connor, J. R., Menzies, S. L., St Martin, S. M., and Mufson, E. J. (1992). "A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains." *J Neurosci Res*, 31(1), 75-83.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., and Pericak-Vance, M. A. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science*, 261(5123), 921-3.
- Cork, L. C., Powers, R. E., Selkoe, D. J., Davies, P., Geyer, J. J., and Price, D. L. (1988). "Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears." *J Neuropathol Exp Neurol*, 47(6), 629-41.
- Crawley, J. N. (2007). *What's Wrong With My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice* Wiley-Liss; 2nd edition.
- Crystal, H., Dickson, D., Fuld, P., Masur, D., Scott, R., Mehler, M., Masdeu, J., Kawas, C., Aronson, M., and Wolfson, L. (1988). "Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease." *Neurology*, 38(11), 1682-7.
- Cummings, B. J., Head, E., Afagh, A. J., Milgram, N. W., and Cotman, C. W. (1996a). "Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine." *Neurobiol Learn Mem*, 66(1), 11-23.
- Cummings, B. J., Head, E., Ruehl, W., Milgram, N. W., and Cotman, C. W. (1996b). "The canine as an animal model of human aging and dementia." *Neurobiol Aging*, 17(2), 259-68.
- Cummings, B. J., Satou, T., Head, E., Milgram, N. W., Cole, G. M., Savage, M. J., Podlisny, M. B., Selkoe, D. J., Siman, R., Greenberg, B. D., and Cotman, C. W. (1996c). "Diffuse plaques contain C-terminal A beta 42 and not A beta 40: evidence from cats and dogs." *Neurobiol Aging*, 17(4), 653-9.
- Chan, A. W. (1999). "Transgenic animals: current and alternative strategies." *Cloning*, 1(1), 25-46.
- Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., YOUNKIN, L., Good, M. A., Bliss, T. V., Hyman, B. T., YOUNKIN, S. G., and Hsiao, K. K. (1999). "Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice." *Nat Neurosci*, 2(3), 271-6.
- Chartier-Harlin, M. C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., Hardy, J., and et al. (1991). "Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene." *Nature*, 353(6347), 844-6.
- Chen, G., Chen, K. S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S. J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S. B., and Morris, R. G. (2000). "A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." *Nature*, 408(6815), 975-9.
- Chen, W. S., and Bear, M. F. (2007). "Activity-dependent regulation of NR2B translation contributes to metaplasticity in mouse visual cortex." *Neuropharmacology*, 52(1), 200-14.
- Cheng, I. H., Palop, J. J., Esposito, L. A., Bien-Ly, N., Yan, F., and Mucke, L. (2004). "Aggressive amyloidosis in mice expressing human amyloid peptides with the Arctic mutation." *Nat Med*, 10(11), 1190-2.
- Cheng, I. H., Searce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J. J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puolivali, J., Lesne, S., Ashe, K. H., Muchowski, P. J., and Mucke, L. (2007). "Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models." *J Biol Chem*, 282(33), 23818-28.
- Chin, J., Palop, J. J., Puolivali, J., Massaro, C., Bien-Ly, N., Gerstein, H., Searce-Levie, K., Masliah, E., and Mucke, L. (2005). "Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci*, 25(42), 9694-703.

- Chishti, M. A., Yang, D. S., Janus, C., Phinney, A. L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., Turner, S., Lozza, G., Grilli, M., Kunicki, S., Morissette, C., Paquette, J., Gervais, F., Bergeron, C., Fraser, P. E., Carlson, G. A., George-Hyslop, P. S., and Westaway, D. (2001). "Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695." *J Biol Chem*, 276(24), 21562-70.
- Dai, Q., Borenstein, A. R., Wu, Y., Jackson, J. C., and Larson, E. B. (2006). "Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project." *Am J Med*, 119(9), 751-9.
- Daigle, I., and Li, C. (1993). "apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24), 12045-9.
- Davies, L., Wolska, B., Hilbich, C., Multhaup, G., Martins, R., Simms, G., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1988). "A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques." *Neurology*, 38(11), 1688-93.
- Davies, N. P., Rosewell, I. R., and Bruggemann, M. (1992). "Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for inter-species gene transfer." *Nucleic Acids Res*, 20(11), 2693-8.
- Davis, D. G., Schmitt, F. A., Wekstein, D. R., and Markesbery, W. R. (1999). "Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects." *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(4), 376-88.
- De Sauvage, F., and Octave, J. N. (1989). "A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possibly secreted protein." *Science*, 245(4918), 651-3.
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2000). "Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein." *J Cell Sci*, 113 (Pt 11), 1857-70.
- Dere, E., Huston, J. P., and De Souza Silva, M. A. (2007). "The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents." *Neurosci Biobehav Rev*, 31(5), 673-704.
- Dewji, N. N., and Do, C. (1996). "Heat shock factor-1 mediates the transcriptional activation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein gene in response to stress." *Brain Res Mol Brain Res*, 35(1-2), 325-8.
- Dillon, N., and Sabbattini, P. (2000). "Functional gene expression domains: defining the functional unit of eukaryotic gene regulation." *Bioessays*, 22(7), 657-65.
- Dinamarca, M. C., Arrazola, M., Toledo, E., Cerpa, W. F., Hancke, J., and Inestrosa, N. C. (2008). "Release of acetylcholinesterase (AChE) from beta-amyloid plaques assemblies improves the spatial memory impairments in APP-transgenic mice." *Chem Biol Interact*, 175(1-3), 142-9.
- Dobson, C. B., Wozniak, M. A., and Itzhaki, R. F. (2003). "Do infectious agents play a role in dementia?" *Trends Microbiol*, 11(7), 312-7.
- Dodart, J. C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., DeLong, C. A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D. M., and Paul, S. M. (2002). "Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model." *Nat Neurosci*, 5(5), 452-7.
- Dodart, J. C., Mathis, C., Saura, J., Bales, K. R., Paul, S. M., and Ungerer, A. (2000). "Neuroanatomical abnormalities in behaviorally characterized APP(V717F) transgenic mice." *Neurobiol Dis*, 7(2), 71-85.
- Dodart, J. C., Meziane, H., Mathis, C., Bales, K. R., Paul, S. M., and Ungerer, A. (1999). "Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein." *Behav Neurosci*, 113(5), 982-90.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., and Younkin, S. (1996). "Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1." *Nature*, 383(6602), 710-3.

- Duff, K., and Huxley, C. (1996). "Targeting mutations to YACs by homologous recombination." *Methods Mol Biol*, 54, 187-98.
- Duff, K., McGuigan, A., Huxley, C., Schulz, F., and Hardy, J. (1994). "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human amyloid precursor protein gene." *Gene Ther*, 1(1), 70-5.
- Duff, K., and Suleman, F. (2004). "Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: how useful have they been for therapeutic development?" *Brief Funct Genomic Proteomic*, 3(1), 47-59.
- Eikelenboom, P., and Stam, F. C. (1982). "Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study." *Acta Neuropathol*, 57(2-3), 239-42.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N., and van Duijn, C. M. (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." *JAMA*, 278(16), 1349-56.
- Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., and Choe, H. (2000). "BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17), 9712-7.
- Fernandez, A., Munoz, D. and Montoliu, L. (2011). "Generation of Transgenic Animals by Use of YACs", in S. Pease, Saunders, T.L., (ed.), *Advanced Protocols for Animal Transgenesis. An ISTT Manual*. Springer.
- Frendewey, D., Chernomorsky, R., Esau, L., Om, J., Xue, Y., Murphy, A. J., Yancopoulos, G. D., and Valenzuela, D. M. (2010). "The loss-of-allele assay for ES cell screening and mouse genotyping." *Methods Enzymol*, 476, 295-307.
- Funato, H., Enya, M., Yoshimura, M., Morishima-Kawashima, M., and Ihara, Y. (1999). "Presence of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein dimers in the hippocampus CA1 not exhibiting neurofibrillary tangle formation." *Am J Pathol*, 155(1), 23-8.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., and et al. (1995). "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein." *Nature*, 373(6514), 523-7.
- Gandy, S. (2005). "The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease." *J Clin Invest*, 115(5), 1121-9.
- Garcia-Alloza, M., Robbins, E. M., Zhang-Nunes, S. X., Purcell, S. M., Betensky, R. A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S. M., Bacskai, B. J., and Frosch, M. P. (2006). "Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease." *Neurobiol Dis*, 24(3), 516-24.
- Gerring, S. L., Connelly, C., and Hieter, P. (1991). "Positional mapping of genes by chromosome blotting and chromosome fragmentation." *Methods Enzymol*, 194, 57-77.
- Ghetti, B., Spina, S., Murrell, J. R., Huey, E. D., Pietrini, P., Sweeney, B., Wassermann, E. M., Keohane, C., Farlow, M. R., and Grafman, J. (2008). "In vivo and postmortem clinicoanatomical correlations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17." *Neurodegener Dis*, 5(3-4), 215-7.
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G., and Hof, P. R. (2003). "Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease." *Neurology*, 60(9), 1495-500.
- Giraldo, P. (2002). *Tesis Doctoral: Análisis funcional y estructural de la región controladora de locus del gen de la tirosinasa de ratón.*, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Giraldo, P., Gimenez, E., and Montoliu, L. (1999). "The use of yeast artificial chromosomes in transgenic animals: expression studies of the tyrosinase gene in transgenic mice." *Genet Anal*, 15(3-5), 175-8.

- Giraldo, P., and Montolieu, L. (2001). "Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals." *Transgenic Res*, 10(2), 83-103.
- Giraldo, P., Rival-Gervier, S., Houdebine, L. M., and Montolieu, L. (2003). "The potential benefits of insulators on heterologous constructs in transgenic animals." *Transgenic Res*, 12(6), 751-5.
- Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochem Biophys Res Commun*, 120(3), 885-90.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., and et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature*, 349(6311), 704-6.
- Goedert, M., Ghetti, B., and Spillantini, M. G. (2012). "Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease." *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(2), a006254.
- Golde, T. E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L. H., and Younkin, S. G. (1990). "Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR." *Neuron*, 4(2), 253-67.
- Gomez-Isla, T., West, H. L., Rebeck, G. W., Harr, S. D., Growdon, J. H., Locascio, J. J., Perls, T. T., Lipsitz, L. A., and Hyman, B. T. (1996). "Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease." *Ann Neurol*, 39(1), 62-70.
- Gordon, M. N., King, D. L., Diamond, D. M., Jantzen, P. T., Boyett, K. V., Hope, C. E., Hatcher, J. M., DiCarlo, G., Gottschall, W. P., Morgan, D., and Arendash, G. W. (2001). "Correlation between cognitive deficits and Abeta deposits in transgenic APP+PS1 mice." *Neurobiol Aging*, 22(3), 377-85.
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R. M. (2001). "Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils." *Science*, 293(5534), 1491-5.
- Graves, A. B., White, E., Koepsell, T. D., Reifler, B. V., van Belle, G., Larson, E. B., and Raskind, M. (1990). "The association between head trauma and Alzheimer's disease." *Am J Epidemiol*, 131(3), 491-501.
- Gray, C. W., and Patel, A. J. (1993). "Regulation of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta in astrocytes." *Brain Res Mol Brain Res*, 19(3), 251-6.
- Greco, S. J., Bryan, K. J., Sarkar, S., Zhu, X., Smith, M. A., Ashford, J. W., Johnston, J. M., Tezapsidis, N., and Casadesus, G. (2010). "Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis*, 19(4), 1155-67.
- Green, E. D., Hieter, P. and Spencer, F.A. (1999). "Yeast Artificial Chromosomes", in E. D. Green, Birren, B., Klapholz, S., Myers, R.M. and Hieter, P., (ed.), *Genome Analysis. A laboratory manual (vol III, cloning System)*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 297-565.
- Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., 3rd, and Araoz, C. (1989). "Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(19), 7611-5.
- Grilli, M., Goffi, F., Memo, M., and Spano, P. (1996). "Interleukin-1beta and glutamate activate the NF-kappaB/Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures." *J Biol Chem*, 271(25), 15002-7.
- Grilli, M., Ribola, M., Alberici, A., Valerio, A., Memo, M., and Spano, P. (1995). "Identification and characterization of a kappa B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene." *J Biol Chem*, 270(45), 26774-7.
- Grueninger, F., Bohrmann, B., Czech, C., Ballard, T. M., Frey, J. R., Weidensteiner, C., von Kienlin, M., and Ozmen, L. (2010). "Phosphorylation of Tau at S422 is enhanced by Abeta in TauPS2APP triple transgenic mice." *Neurobiol Dis*, 37(2), 294-306.
- Haass, C. (2004). "Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation." *EMBO J*, 23(3), 483-8.

- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Oltersdorf, T., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1993). "Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules." *Ann N Y Acad Sci*, 695, 109-16.
- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D. J. (1995). "The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway." *Nat Med*, 1(12), 1291-6.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., and et al. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." *Nature*, 359(6393), 322-5.
- Hamer, L., Johnston, M., and Green, E. D. (1995). "Isolation of yeast artificial chromosomes free of endogenous yeast chromosomes: construction of alternate hosts with defined karyotypic alterations." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(25), 11706-10.
- Hampel, H., Blennow, K., Shaw, L. M., Hoessler, Y. C., Zetterberg, H., and Trojanowski, J. Q. (2010). "Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease." *Exp Gerontol*, 45(1), 30-40.
- Hardy, J., and Allsop, D. (1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease." *Trends Pharmacol Sci*, 12(10), 383-8.
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science*, 297(5580), 353-6.
- Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science*, 256(5054), 184-5.
- Herzig, M. C., Winkler, D. T., Burgermeister, P., Pfeifer, M., Kohler, E., Schmidt, S. D., Danner, S., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Burki, K., van Duinen, S. G., Maat-Schieman, M. L., Staufenbiel, M., Mathews, P. M., and Jucker, M. (2004). "Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis." *Nat Neurosci*, 7(9), 954-60.
- Hiemisch, H., Schutz, G., and Kaestner, K. H. (1997). "Transcriptional regulation in endoderm development: characterization of an enhancer controlling Hnf3g expression by transgenesis and targeted mutagenesis." *EMBO J*, 16(13), 3995-4006.
- Higgins, L. S., Holtzman, D. M., Rabin, J., Mobley, W. C., and Cordell, B. (1994). "Transgenic mouse brain histopathology resembles early Alzheimer's disease." *Ann Neurol*, 35(5), 598-607.
- Higuchi, M., Ishihara, T., Zhang, B., Hong, M., Andreadis, A., Trojanowski, J., and Lee, V. M. (2002). "Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration." *Neuron*, 35(3), 433-46.
- Hinnen, A., Hicks, J. B., and Fink, G. R. (1978). "Transformation of yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(4), 1929-33.
- Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D. J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Li, X. J., Stevens, M. E., Rosemond, E., Roder, J. C., Phillips, A. G., Rubin, E. M., Hersch, S. M., and Hayden, M. R. (1999). "A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration." *Neuron*, 23(1), 181-92.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. and Lacy, E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Holcomb, L., Gordon, M. N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C. M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K., and Duff, K. (1998). "Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes." *Nat Med*, 4(1), 97-100.

- Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Woolford, J., Dean, C., Kerr, S., Culliford, D., and Perry, V. H. (2009). "Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease." *Neurology*, 73(10), 768-74.
- Honjo, K., van Reekum, R., and Verhoeff, N. P. (2009). "Alzheimer's disease and infection: do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease?" *Alzheimers Dement*, 5(4), 348-60.
- Horn, R., Ostertun, B., Fric, M., Solymosi, L., Steudel, A., and Moller, H. J. (1996). "Atrophy of hippocampus in patients with Alzheimer's disease and other diseases with memory impairment." *Dementia*, 7(4), 182-6.
- Howlett, D. R., Bowler, K., Soden, P. E., Riddell, D., Davis, J. B., Richardson, J. C., Burbidge, S. A., Gonzalez, M. I., Irving, E. A., Lawman, A., Miglio, G., Dawson, E. L., Howlett, E. R., and Hussain, I. (2008). "Abeta deposition and related pathology in an APP x PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Histol Histopathol*, 23(1), 67-76.
- Howlett, D. R., Richardson, J. C., Austin, A., Parsons, A. A., Bate, S. T., Davies, D. C., and Gonzalez, M. I. (2004). "Cognitive correlates of Abeta deposition in male and female mice bearing amyloid precursor protein and presenilin-1 mutant transgenes." *Brain Res*, 1017(1-2), 130-6.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). "Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." *Science*, 274(5284), 99-102.
- Hsiao, K. K., Borchelt, D. R., Olson, K., Johannsdottir, R., Kitt, C., Yunis, W., Xu, S., Eckman, C., Younkin, S., Price, D., and et al. (1995). "Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins." *Neuron*, 15(5), 1203-18.
- Huber, G., Martin, J. R., Loffler, J., and Moreau, J. L. (1993). "Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: an indirect antibody approach." *Brain Res*, 603(2), 348-52.
- Hugerat, Y., Spencer, F., Zenvirth, D., and Simchen, G. (1994). "A versatile method for efficient YAC transfer between any two strains." *Genomics*, 22(1), 108-17.
- Hughes, E. D., Qu, Y. Y., Genik, S. J., Lyons, R. H., Pacheco, C. D., Lieberman, A. P., Samuelson, L. C., Nasonkin, I. O., Camper, S. A., Van Keuren, M. L., and Saunders, T. L. (2007). "Genetic variation in C57BL/6 ES cell lines and genetic instability in the Bruce4 C57BL/6 ES cell line." *Mamm Genome*, 18(8), 549-58.
- Hughes, R. N. (2004). "The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory." *Neurosci Biobehav Rev*, 28(5), 497-505.
- Hung, S. C., Cheng, H., Pan, C. Y., Tsai, M. J., Kao, L. S., and Ma, H. L. (2002). "In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells." *Stem Cells*, 20(6), 522-9.
- Huszar, D., Balling, R., Kothary, R., Magli, M. C., Hozumi, N., Rossant, J., and Bernstein, A. (1985). "Insertion of a bacterial gene into the mouse germ line using an infectious retrovirus vector." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(24), 8587-91.
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Che, L. K., Norton, J., Morris, J. C., Reed, L. A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P. R., Hayward, N., Kwok, J. B., Schofield, P. R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B. A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T., and Heutink, P. (1998). "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17." *Nature*, 393(6686), 702-5.
- Huxley, C., Green, E. D., and Dunham, I. (1990). "Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR." *Trends Genet*, 6(8), 236.

- Hyman, B. T., Marzloff, K., and Arriagada, P. V. (1993). *The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution.*
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R., and Barnes, C. L. (1984). "Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation." *Science*, 225(4667), 1168-70.
- Ignatius, M. J., Gebicke-Harter, P. J., Skene, J. H., Schilling, J. W., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., and Shooter, E. M. (1986). "Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(4), 1125-9.
- Irizarry, M. C., McNamara, M., Fedorchak, K., Hsiao, K., and Hyman, B. T. (1997a). "APP^{Sw} transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1." *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(9), 965-73.
- Irizarry, M. C., Soriano, F., McNamara, M., Page, K. J., Schenk, D., Games, D., and Hyman, B. T. (1997b). "A beta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse." *J Neurosci*, 17(18), 7053-9.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *J Bacteriol*, 153(1), 163-8.
- Itzhaki, R. F., Lin, W. R., Shang, D., Wilcock, G. K., Faragher, B., and Jamieson, G. A. (1997). "Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease." *Lancet*, 349(9047), 241-4.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). "Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)." *Neuron*, 13(1), 45-53.
- Iyengar, A., Muller, F., and Maclean, N. (1996). "Regulation and expression of transgenes in fish -- a review." *Transgenic Res*, 5(3), 147-66.
- Jacobsen, J. S., Blume, A. J., and Vitek, M. P. (1991). "Quantitative measurement of alternatively spliced amyloid precursor protein mRNA expression in Alzheimer's disease and normal brain by S1 nuclease protection analysis." *Neurobiol Aging*, 12(5), 585-92.
- Jakobovits, A., Moore, A. L., Green, L. L., Vergara, G. J., Maynard-Currie, C. E., Austin, H. A., and Klapholz, S. (1993). "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome." *Nature*, 362(6417), 255-8.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., Chishti, M. A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H. T., Nixon, R. A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P. E., St George-Hyslop, P., and Westaway, D. (2000). "A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease." *Nature*, 408(6815), 979-82.
- Janus, C., and Westaway, D. (2001). "Transgenic mouse models of Alzheimer's disease." *Physiol Behav*, 73(5), 873-86.
- Jellinger, K. A. (2004). "Head injury and dementia." *Curr Opin Neurol*, 17(6), 719-23.
- Johnson-Wood, K., Lee, M., Motter, R., Hu, K., Gordon, G., Barbour, R., Khan, K., Gordon, M., Tan, H., Games, D., Lieberburg, I., Schenk, D., Seubert, P., and McConlogue, L. (1997). "Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(4), 1550-5.
- Johnstone, E. M., Chaney, M. O., Norris, F. H., Pascual, R., and Little, S. P. (1991). "Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis." *Brain Res Mol Brain Res*, 10(4), 299-305.
- Jucker, M., Walker, L. C., Martin, L. J., Kitt, C. A., Kleinman, H. K., Ingram, D. K., and Price, D. L. (1992). "Age-associated inclusions in normal and transgenic mouse brain." *Science*, 255(5050), 1443-5.

- Kalaria, R. N., and Grahovac, I. (1990). "Serum amyloid P immunoreactivity in hippocampal tangles, plaques and vessels: implications for leakage across the blood-brain barrier in Alzheimer's disease." *Brain Res*, 516(2), 349-53.
- Kamino, K., Orr, H. T., Payami, H., Wijsman, E. M., Alonso, M. E., Pulst, S. M., Anderson, L., O'Dahl, S., Nemens, E., White, J. A., and et al. (1992). "Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region." *Am J Hum Genet*, 51(5), 998-1014.
- Kammesheidt, A., Boyce, F. M., Spanoyannis, A. F., Cummings, B. J., Ortegon, M., Cotman, C., Vaught, J. L., and Neve, R. L. (1992). "Deposition of beta/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor in the brain." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(22), 10857-61.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature*, 325(6106), 733-6.
- Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe, K. H., and Younkin, S. G. (2001). "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci*, 21(2), 372-81.
- Kelly, P. H., Bondolfi, L., Hunziker, D., Schlecht, H. P., Carver, K., Maguire, E., Abramowski, D., Wiederhold, K. H., Sturchler-Pierrat, C., Jucker, M., Bergmann, R., Staufenbiel, M., and Sommer, B. (2003). "Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice." *Neurobiol Aging*, 24(2), 365-78.
- Kidd, M. (1963). "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." *Nature*, 197, 192-3.
- Kidwell, M. G. (2002). "Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes." *Genetica*, 115(1), 49-63.
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003). "Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11), 6382-7.
- King, D. L., Arendash, G. W., Crawford, F., Sterk, T., Menendez, J., and Mullan, M. J. (1999). "Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease." *Behav Brain Res*, 103(2), 145-62.
- Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C., and Hyman, B. T. (2003). "Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes." *J Cell Sci*, 116(Pt 16), 3339-46.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988). "Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity." *Nature*, 331(6156), 530-2.
- Klein, W. L., Krafft, G. A., and Finch, C. E. (2001). "Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?" *Trends Neurosci*, 24(4), 219-24.
- Klyubin, I., Betts, V., Welzel, A. T., Blennow, K., Zetterberg, H., Wallin, A., Lemere, C. A., Cullen, W. K., Peng, Y., Wisniewski, T., Selkoe, D. J., Anwyl, R., Walsh, D. M., and Rowan, M. J. (2008). "Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization." *J Neurosci*, 28(16), 4231-7.
- Kobayashi, D. T., and Chen, K. S. (2005). "Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease." *Genes Brain Behav*, 4(3), 173-96.
- Koistinaho, M., Ort, M., Cimadevilla, J. M., Vondrous, R., Cordell, B., Koistinaho, J., Bures, J., and Higgins, L. S. (2001). "Specific spatial learning deficits become severe with age in beta - amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta -amyloid deposits but do not form plaques." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25), 14675-80.

- Kokjohn, T. A., and Roher, A. E. (2009). "Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: understanding the paradigms, limitations, and contributions." *Alzheimers Dement*, 5(4), 340-7.
- König, G., Monning, U., Czech, C., Prior, R., Banati, R., Schreiter-Gasser, U., Bauer, J., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1992). "Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells." *J Biol Chem*, 267(15), 10804-9.
- Köntgen, F., and Stewart, C. L. (1993). "Simple screening procedure to detect gene targeting events in embryonic stem cells." *Methods Enzymol*, 225, 878-90.
- Kosik, K. S., Duffy, L. K., Dowling, M. M., Abraham, C., McCluskey, A., and Selkoe, D. J. (1984). "Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(24), 7941-5.
- Kuhn, R. M., and Ludwig, R. A. (1994). "Complete sequence of the yeast artificial chromosome cloning vector pYAC4." *Gene*, 141(1), 125-7.
- Kukull, W. A., Brenner, D. E., Speck, C. E., Nochlin, D., Bowen, J., McCormick, W., Teri, L., Pfanschmidt, M. L., and Larson, E. B. (1994). "Causes of death associated with Alzheimer disease: variation by level of cognitive impairment before death." *J Am Geriatr Soc*, 42(7), 723-6.
- Kulnane, L. S., and Lamb, B. T. (2001). "Neuropathological characterization of mutant amyloid precursor protein yeast artificial chromosome transgenic mice." *Neurobiol Dis*, 8(6), 982-92.
- Kurt, M. A., Davies, D. C., Kidd, M., Duff, K., Rolph, S. C., Jennings, K. H., and Howlett, D. R. (2001). "Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes." *Exp Neurol*, 171(1), 59-71.
- La Fauci, G., Lahiri, D. K., Salton, S. R., and Robakis, N. K. (1989). "Characterization of the 5'-end region and the first two exons of the beta-protein precursor gene." *Biochem Biophys Res Commun*, 159(1), 297-304.
- La Spada, A. R., Peterson, K. R., Meadows, S. A., McClain, M. E., Jeng, G., Chmelar, R. S., Haugen, H. A., Chen, K., Singer, M. J., Moore, D., Trask, B. J., Fischbeck, K. H., Clegg, C. H., and McKnight, G. S. (1998). "Androgen receptor YAC transgenic mice carrying CAG 45 alleles show trinucleotide repeat instability." *Hum Mol Genet*, 7(6), 959-67.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, 227(5259), 680-5.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., and Oddo, S. (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci*, 8(7), 499-509.
- LaFerla, F. M., Tinkle, B. T., Bieberich, C. J., Haudenschild, C. C., and Jay, G. (1995). "The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice." *Nat Genet*, 9(1), 21-30.
- Lalonde, R. (2002). "The neurobiological basis of spontaneous alternation." *Neurosci Biobehav Rev*, 26(1), 91-104.
- LaMarco, K., Thompson, C. C., Byers, B. P., Walton, E. M., and McKnight, S. L. (1991). "Identification of Ets- and notch-related subunits in GA binding protein." *Science*, 253(5021), 789-92.
- Lamb, B. T., Call, L. M., Slunt, H. H., Bardel, K. A., Lawler, A. M., Eckman, C. B., Younkin, S. G., Holtz, G., Wagner, S. L., Price, D. L., Sisodia, S. S., and Gearhart, J. D. (1997). "Altered metabolism of familial Alzheimer's disease-linked amyloid precursor protein variants in yeast artificial chromosome transgenic mice." *Hum Mol Genet*, 6(9), 1535-41.
- Lamb, B. T., Sisodia, S. S., Lawler, A. M., Slunt, H. H., Kitt, C. A., Kearns, W. G., Pearson, P. L., Price, D. L., and Gearhart, J. D. (1993). "Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]." *Nat Genet*, 5(1), 22-30.

- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fievet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., Franck, A., Helisalmi, S., Porcellini, E., Hanon, O., de Pancorbo, M. M., Lendon, C., Dufouil, C., Jaillard, C., Leveillard, T., Alvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossu, P., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Hannequin, D., Licastro, F., Soininen, H., Ritchie, K., Blanche, H., Dartigues, J. F., Tzourio, C., Gut, I., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M., and Amouyel, P. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease." *Nat Genet*, 41(10), 1094-9.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature*, 409(6822), 860-921.
- Larin, Z., Monaco, A. P., and Lehrach, H. (1991). "Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(10), 4123-7.
- Latchman, D. S. (1997a). "Herpes simplex virus and risk of Alzheimer's disease." *Lancet*, 349(9058), 1101; author reply 1101-2.
- Latchman, D. S. (1997b). "Transcription factors: an overview." *Int J Biochem Cell Biol*, 29(12), 1305-12.
- LeBlanc, A. C., Chen, H. Y., Autilio-Gambetti, L., and Gambetti, P. (1991). "Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures." *FEBS Lett*, 292(1-2), 171-8.
- Lee, M. K., Borchelt, D. R., Kim, G., Thinakaran, G., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Martin, L. J., Kittur, A., Gandy, S., Levey, A. I., Jenkins, N., Copeland, N., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1997). "Hyperaccumulation of FAD-linked presenilin 1 variants in vivo." *Nat Med*, 3(7), 756-60.
- Lee, V. M., Balin, B. J., Otvos, L., Jr., and Trojanowski, J. Q. (1991). "A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau." *Science*, 251(4994), 675-8.
- Lehman, E. J., Kulnane, L. S., Gao, Y., Petriello, M. C., Pimpis, K. M., Younkin, L., Dolios, G., Wang, R., Younkin, S. G., and Lamb, B. T. (2003). "Genetic background regulates beta-amyloid precursor protein processing and beta-amyloid deposition in the mouse." *Hum Mol Genet*, 12(22), 2949-56.
- Lehmann, D. J., Johnston, C., and Smith, A. D. (1997). "Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease." *Hum Mol Genet*, 6(11), 1933-6.
- Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K. H. (2006). "A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory." *Nature*, 440(7082), 352-7.

- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Wang, K., and et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." *Science*, 269(5226), 973-7.
- Levy, E., Carman, M. D., Fernandez-Madrid, I. J., Power, M. D., Lieberburg, I., van Duinen, S. G., Bots, G. T., Luyendijk, W., and Frangione, B. (1990). "Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type." *Science*, 248(4959), 1124-6.
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W. L., Yen, S. H., Dickson, D. W., Davies, P., and Hutton, M. (2000). "Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein." *Nat Genet*, 25(4), 402-5.
- Leyssen, M., Ayaz, D., Hebert, S. S., Reeve, S., De Strooper, B., and Hassan, B. A. (2005). "Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the Drosophila brain." *EMBO J*, 24(16), 2944-55.
- Li, H., Strati, K., Dominguez, V., Martín, J., Blasco, M., Serrano, M. and Ortega, S. (2011). "Induced Pluripotency: Generation of iPS Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts", in S. Pease S., T.L., (ed.), *Advanced Protocols for Animal Transgenesis. An ISTT Manual.*: Springer.
- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hebert, R., Helliwell, B., Hill, G. B., and McDowell, I. (2002). "Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging." *Am J Epidemiol*, 156(5), 445-53.
- Liu, P., Zhang, H., McLellan, A., Vogel, H., and Bradley, A. (1998). "Embryonic lethality and tumorigenesis caused by segmental aneuploidy on mouse chromosome 11." *Genetics*, 150(3), 1155-68.
- Liu, X., Wu, H., Loring, J., Hormuzdi, S., Disteche, C. M., Bornstein, P., and Jaenisch, R. (1997). "Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission." *Dev Dyn*, 209(1), 85-91.
- Loers, G., Aboul-Enein, F., Bartsch, U., Lassmann, H., and Schachner, M. (2004). "Comparison of myelin, axon, lipid, and immunopathology in the central nervous system of differentially myelin-compromised mutant mice: a morphological and biochemical study." *Mol Cell Neurosci*, 27(2), 175-89.
- Longo, L., Bygrave, A., Grosveld, F. G., and Pandolfi, P. P. (1997). "The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism." *Transgenic Res*, 6(5), 321-8.
- Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., and Markesbery, W. R. (1998). "Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques." *J Neurol Sci*, 158(1), 47-52.
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., and Rogers, J. (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." *Am J Pathol*, 155(3), 853-62.
- Lyubartseva, G., and Lovell, M. A. (2012). "A potential role for zinc alterations in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Biofactors*, 38(2), 98-106.
- Mahley, R. W., and Huang, Y. (1999). "Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond." *Curr Opin Lipidol*, 10(3), 207-17.
- Mahley, R. W., and Rall, S. C., Jr. (2000). "Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein." *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 1, 507-37.
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., and Huang, Y. (2006). "Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(15), 5644-51.
- Mandavilli, A. (2006). "The amyloid code." *Nat Med*, 12(7), 747-51.

- Marin, R., Guerra, B., Hernandez-Jimenez, J. G., Kang, X. L., Fraser, J. D., Lopez, F. J., and Alonso, R. (2003). "Estradiol prevents amyloid-beta peptide-induced cell death in a cholinergic cell line via modulation of a classical estrogen receptor." *Neuroscience*, 121(4), 917-26.
- Markie, D. (1995). *YAC Protocols. Methods in Molecular Biology*: Humana Press
- Masters, C. L., and Beyreuther, K. (2006). "Pathways to the discovery of the Abeta amyloid of Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis*, 9(3 Suppl), 155-61.
- Mattson, M. P., Gary, D. S., Chan, S. L., and Duan, W. (2001). "Perturbed endoplasmic reticulum function, synaptic apoptosis and the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Biochem Soc Symp*(67), 151-62.
- Mayor, C., Brudno, M., Schwartz, J. R., Poliakov, A., Rubin, E. M., Frazer, K. A., Pachter, L. S., and Dubchak, I. (2000). "VISTA : visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length." *Bioinformatics*, 16(11), 1046-7.
- McCool, M. F., Varty, G. B., Del Vecchio, R. A., Kazdoba, T. M., Parker, E. M., Hunter, J. C., and Hyde, L. A. (2003). "Increased auditory startle response and reduced prepulse inhibition of startle in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein." *Brain Res*, 994(1), 99-106.
- McCormick, S. P., Ng, J. K., Taylor, S., Flynn, L. M., Hammer, R. E., and Young, S. G. (1995). "Mutagenesis of the human apolipoprotein B gene in a yeast artificial chromosome reveals the site of attachment for apolipoprotein(a)." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(22), 10147-51.
- McGeer, P. L., Kawamata, T., and Walker, D. G. (1992). "Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue." *Brain Res*, 579(2), 337-41.
- McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (2001). "Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease." *Neurobiol Aging*, 22(6), 799-809.
- McGowan, E., Sanders, S., Iwatsubo, T., Takeuchi, A., Saido, T., Zehr, C., Yu, X., Uljon, S., Wang, R., Mann, D., Dickson, D., and Duff, K. (1999). "Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes." *Neurobiol Dis*, 6(4), 231-44.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E. M. (1984). "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." *Neurology*, 34(7), 939-44.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I., and Masters, C. L. (1999). "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease." *Ann Neurol*, 46(6), 860-6.
- Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., and Ungerer, A. (1998). "Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21), 12683-8.
- Mileusnic, R., Lancashire, C. L., Johnston, A. N., and Rose, S. P. (2000). "APP is required during an early phase of memory formation." *Eur J Neurosci*, 12(12), 4487-95.
- Miller, C. C., Brion, J. P., Calvert, R., Chin, T. K., Eagles, P. A., Downes, M. J., Flament-Durand, J., Haugh, M., Kahn, J., Probst, A., and et al. (1986). "Alzheimer's paired helical filaments share epitopes with neurofilament side arms." *EMBO J*, 5(2), 269-76.
- Mizuguchi, M., Ikeda, K., and Kim, S. U. (1992). "Differential distribution of cellular forms of beta-amyloid precursor protein in murine glial cell cultures." *Brain Res*, 584(1-2), 219-25.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reverse, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C. V., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B., and Van Leuven, F. (1999). "Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain." *J Biol Chem*, 274(10), 6483-92.

- Molgaard, C. A., Stanford, E. P., Morton, D. J., Ryden, L. A., Schubert, K. R., and Golbeck, A. L. (1990). "Epidemiology of head trauma and neurocognitive impairment in a multi-ethnic population." *Neuroepidemiology*, 9(5), 233-42.
- Molto, E., Fernandez, A., and Montoliu, L. (2009). "Boundaries in vertebrate genomes: different solutions to adequately insulate gene expression domains." *Brief Funct Genomic Proteomic*, 8(4), 283-96.
- Monaco, A. P., and Larin, Z. (1994). "YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools." *Trends Biotechnol*, 12(7), 280-6.
- Montoliu, L. (1997). *Generation of transgenic mice: A laboratory manual*, Heidelberg: German Cancer Research Center.
- Montoliu, L. (2012). "Mendel: a simple excel workbook to compare the observed and expected distributions of genotypes/phenotypes in transgenic and knockout mouse crosses involving up to three unlinked loci by means of a chi2 test." *Transgenic Res*, 21(3), 677-81.
- Montoliu, L., Roy, R., Regales, L., and Garcia-Diaz, A. (2009). "Design of vectors for transgene expression: The use of genomic comparative approaches." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 32(2), 81-90.
- Montoliu, L., Schedl, A., Kelsey, G., Lichter, P., Larin, Z., Lehrach, H., and Schutz, G. (1993). "Generation of transgenic mice with yeast artificial chromosomes." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 58, 55-62.
- Montoliu, L., Umland, T., and Schutz, G. (1996). "A locus control region at -12 kb of the tyrosinase gene." *EMBO J*, 15(22), 6026-34.
- Montoliu, L., and Whitelaw, C. B. (2011). "Using standard nomenclature to adequately name transgenes, knockout gene alleles and any mutation associated to a genetically modified mouse strain." *Transgenic Res*, 20(2), 435-40.
- Moreira, P. N., Giraldo, P., Cozar, P., Pozueta, J., Jimenez, A., Montoliu, L., and Gutierrez-Adan, A. (2004). "Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection." *Biol Reprod*, 71(6), 1943-7.
- Moreira, P. N., Pozueta, J., Giraldo, P., Gutierrez-Adan, A., and Montoliu, L. (2006). "Generation of yeast artificial chromosome transgenic mice by intracytoplasmic sperm injection." *Methods Mol Biol*, 349, 151-61.
- Moreira, P. N., Pozueta, J., Perez-Crespo, M., Valdivieso, F., Gutierrez-Adan, A., and Montoliu, L. (2007). "Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI." *Transgenic Res*, 16(2), 163-8.
- Morimoto, T., Ohsawa, I., Takamura, C., Ishiguro, M., and Kohsaka, S. (1998). "Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons." *J Neurosci Res*, 51(2), 185-95.
- Morris, R. (1984). "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat." *J Neurosci Methods*, 11(1), 47-60.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., and O'Keefe, J. (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." *Nature*, 297(5868), 681-3.
- Morrison, J. H., and Hof, P. R. (1997). "Life and death of neurons in the aging brain." *Science*, 278(5337), 412-9.
- Mouri, A., Noda, Y., Hara, H., Mizoguchi, H., Tabira, T., and Nabeshima, T. (2007). "Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model." *FASEB J*, 21(9), 2135-48.
- Mucke, L., Masliah, E., Johnson, W. B., Ruppe, M. D., Alford, M., Rockenstein, E. M., Forss-Petter, S., Pietropaolo, M., Mallory, M., and Abraham, C. R. (1994). "Synaptotrophic effects of human amyloid beta protein precursors in the cortex of transgenic mice." *Brain Res*, 666(2), 151-67.

- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). "High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." *J Neurosci*, 20(11), 4050-8.
- Mufson, E. J., Chen, E. Y., Cochran, E. J., Beckett, L. A., Bennett, D. A., and Kordower, J. H. (1999). "Entorhinal cortex beta-amyloid load in individuals with mild cognitive impairment." *Exp Neurol*, 158(2), 469-90.
- Mulvihill, P., and Perry, G. (1989). "Immunoaffinity demonstration that paired helical filaments of Alzheimer disease share epitopes with neurofilaments, MAP2 and tau." *Brain Res*, 484(1-2), 150-6.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid." *Nat Genet*, 1(5), 345-7.
- Munoz, D. G., and Feldman, H. (2000). "Causes of Alzheimer's disease." *CMAJ*, 162(1), 65-72.
- Murai, H., Pierce, J. E., Raghupathi, R., Smith, D. H., Saatman, K. E., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Loring, J. F., Eckman, C., Younkin, S., and McIntosh, T. K. (1998). "Twofold overexpression of human beta-amyloid precursor proteins in transgenic mice does not affect the neuromotor, cognitive, or neurodegenerative sequelae following experimental brain injury." *J Comp Neurol*, 392(4), 428-38.
- Murray, A. W., and Szostak, J. W. (1983). "Construction of artificial chromosomes in yeast." *Nature*, 305(5931), 189-93.
- Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., and Benson, M. D. (1991). "A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease." *Science*, 254(5028), 97-9.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. and Behringer, R. (2003). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Third Edition)*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nalbantoglu, J., Tirado-Santiago, G., Lahsaini, A., Poirier, J., Goncalves, O., Verge, G., Momoli, F., Welner, S. A., Massicotte, G., Julien, J. P., and Shapiro, M. L. (1997). "Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein." *Nature*, 387(6632), 500-5.
- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., and Ikeda, K. (1991). "Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease." *Brain Res*, 541(1), 163-6.
- Neve, R. L., Finch, E. A., and Dawes, L. R. (1988). "Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain." *Neuron*, 1(8), 669-77.
- Nicoll, J. A., Mrak, R. E., Graham, D. I., Stewart, J., Wilcock, G., MacGowan, S., Esiri, M. M., Murray, L. S., Dewar, D., Love, S., Moss, T., and Griffin, W. S. (2000). "Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease." *Ann Neurol*, 47(3), 365-8.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y., and Ogata, E. (1993). "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)." *Nature*, 362(6415), 75-9.
- Nussbaum, R. L., and Ellis, C. E. (2003). "Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *N Engl J Med*, 348(14), 1356-64.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., and LaFerla, F. M. (2003b). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging*, 24(8), 1063-70.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., and LaFerla, F. M. (2003a). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." *Neuron*, 39(3), 409-21.

- Oddo, S., Caccamo, A., Smith, I. F., Green, K. N., and LaFerla, F. M. (2006). "A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta." *Am J Pathol*, 168(1), 184-94.
- Ohno, S. (1972). "Simplicity of mammalian regulatory systems." *Dev Biol*, 27(1), 131-6.
- Okuizumi, K., Onodera, O., Namba, Y., Ikeda, K., Yamamoto, T., Seki, K., Ueki, A., Nanko, S., Tanaka, H., Takahashi, H., Oyanagi, K., Mizusawa, H., Kanazawa, I., and Tsuji, S. (1995). "Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease." *Nat Genet*, 11(2), 207-9.
- Olson, S. A. (1994). "MacVector: sequence comparisons using a matrix method." *Methods Mol Biol*, 25, 215-25.
- Orr-Weaver, T. L., and Szostak, J. W. (1983a). "Multiple, tandem plasmid integration in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol*, 3(4), 747-9.
- Orr-Weaver, T. L., and Szostak, J. W. (1983b). "Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(14), 4417-21.
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., and Rothstein, R. J. (1981). "Yeast transformation: a model system for the study of recombination." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(10), 6354-8.
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., and Rothstein, R. J. (1983). "Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids." *Methods Enzymol*, 101, 228-45.
- Ouimet, C. C., Baerwald, K. D., Gandy, S. E., and Greengard, P. (1994). "Immunocytochemical localization of amyloid precursor protein in rat brain." *J Comp Neurol*, 348(2), 244-60.
- Palop, J. J., Jones, B., Kekoni, L., Chin, J., Yu, G. Q., Raber, J., Masliah, E., and Mucke, L. (2003). "Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16), 9572-7.
- Papassotiropoulos, A., Bagli, M., Kurz, A., Kornhuber, J., Forstl, H., Maier, W., Pauls, J., Lautenschlager, N., and Heun, R. (2000). "A genetic variation of cathepsin D is a major risk factor for Alzheimer's disease." *Ann Neurol*, 47(3), 399-403.
- Pavan, W. J., Hieter, P., and Reeves, R. H. (1990a). "Generation of deletion derivatives by targeted transformation of human-derived yeast artificial chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(4), 1300-4.
- Pavan, W. J., Hieter, P., and Reeves, R. H. (1990b). "Modification and transfer into an embryonal carcinoma cell line of a 360-kilobase human-derived yeast artificial chromosome." *Mol Cell Biol*, 10(8), 4163-9.
- Pearson, B. E., and Choi, T. K. (1993). "Expression of the human beta-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22), 10578-82.
- Pearson, H. A., and Peers, C. (2006). "Physiological roles for amyloid beta peptides." *J Physiol*, 575(Pt 1), 5-10.
- Pennisi, E. (2000). "Human genome. Finally, the book of life and instructions for navigating it." *Science*, 288(5475), 2304-7.
- Pericak-Vance, M. A., and Haines, J. L. (1995). "Genetic susceptibility to Alzheimer disease." *Trends Genet*, 11(12), 504-8.
- Perrod, S., and Gasser, S. M. (2003). "Long-range silencing and position effects at telomeres and centromeres: parallels and differences." *Cell Mol Life Sci*, 60(11), 2303-18.
- Perry, G., Cras, P., Siedlak, S. L., Tabaton, M., and Kawai, M. (1992). "Beta protein immunoreactivity is found in the majority of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." *Am J Pathol*, 140(2), 283-90.
- Perry, G., Friedman, R., Shaw, G., and Chau, V. (1987). "Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(9), 3033-6.
- Perry, G., Siedlak, S. L., Richey, P., Kawai, M., Cras, P., Kalaria, R. N., Galloway, P. G., Scardina, J. M., Cordell, B., Greenberg, B. D., and et al. (1991). "Association of heparan sulfate

- proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." *J Neurosci*, 11(11), 3679-83.
- Peterson, K. R. (1997). "Production and analysis of transgenic mice containing yeast artificial chromosomes." *Genet Eng (N Y)*, 19, 235-55.
- Phillips, R. G., and LeDoux, J. E. (1992). "Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning." *Behav Neurosci*, 106(2), 274-85.
- Pietropaolo, S., Feldon, J., and Yee, B. K. (2008). "Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease." *Behav Neurosci*, 122(4), 733-47.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., and Gauthier, S. (1993). "Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease." *Lancet*, 342(8873), 697-9.
- Pollwein, P. (1993). "Overlapping binding sites of two different transcription factors in the promoter of the human gene for the Alzheimer amyloid precursor protein." *Biochem Biophys Res Commun*, 190(2), 637-47.
- Poorkaj, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W. C., Raskind, M., and Schellenberg, G. D. (1998). "Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia." *Ann Neurol*, 43(6), 815-25.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. A., and Herms, J. (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." *J Neurosci*, 26(27), 7212-21.
- Providenti, M. A., O'Brien, J. M., Ewing, R. J., Paterson, E. S., and Smith, M. L. (2006). "The copy-number of plasmids and other genetic elements can be determined by SYBR-Green-based quantitative real-time PCR." *J Microbiol Methods*, 65(3), 476-87.
- Pype, S., Moechars, D., Dillen, L., and Mercken, M. (2003). "Characterization of amyloid beta peptides from brain extracts of transgenic mice overexpressing the London mutant of human amyloid precursor protein." *J Neurochem*, 84(3), 602-9.
- Qian, S., Jiang, P., Guan, X. M., Singh, G., Trumbauer, M. E., Yu, H., Chen, H. Y., Van de Ploeg, L. H., and Zheng, H. (1998). "Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta1-42/43 expression." *Neuron*, 20(3), 611-7.
- Querfurth, H. W., and LaFerla, F. M. (2010). "Alzheimer's disease." *N Engl J Med*, 362(4), 329-44.
- Quitschke, W. W. (1994). "Two nuclear factor binding domains activate expression from the human amyloid beta-protein precursor promoter." *J Biol Chem*, 269(33), 21229-33.
- Quitschke, W. W., Matthews, J. P., Kraus, R. J., and Vostrov, A. A. (1996). "The initiator element and proximal upstream sequences affect transcriptional activity and start site selection in the amyloid beta-protein precursor promoter." *J Biol Chem*, 271(36), 22231-9.
- Raber, J., Wong, D., Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Pitas, R. E., Mahley, R. W., and Mucke, L. (1998). "Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18), 10914-9.
- Rebeck, G. W., Harr, S. D., Strickland, D. K., and Hyman, B. T. (1995). "Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an apolipoprotein E receptor, the alpha 2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related protein." *Ann Neurol*, 37(2), 211-7.
- Redwine, J. M., Kosofsky, B., Jacobs, R. E., Games, D., Reilly, J. F., Morrison, J. H., Young, W. G., and Bloom, F. E. (2003). "Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3), 1381-6.
- Reeves, R. H., Pavan, W. J., and Hieter, P. (1990). "Modification and manipulation of mammalian DNA cloned as YACs." *Genet Anal Tech Appl*, 7(5), 107-13.
- Rhein, V., Song, X., Wiesner, A., Ittner, L. M., Baysang, G., Meier, F., Ozmen, L., Bluethmann, H., Droese, S., Brandt, U., Savaskan, E., Czech, C., Gotz, J., and Eckert, A. (2009). "Amyloid-beta

- and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(47), 20057-62.
- Riley, J. H., Morten, J. E., and Anand, R. (1992). "Targeted integration of neomycin into yeast artificial chromosomes (YACs) for transfection into mammalian cells." *Nucleic Acids Res*, 20(12), 2971-6.
- Robakis, N. K., Ramakrishna, N., Wolfe, G., and Wisniewski, H. M. (1987a). "Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(12), 4190-4.
- Robakis, N. K., Wisniewski, H. M., Jenkins, E. C., Devine-Gage, E. A., Houck, G. E., Yao, X. L., Ramakrishna, N., Wolfe, G., Silverman, W. P., and Brown, W. T. (1987b). "Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome." *Lancet*, 1(8529), 384-5.
- Rockenstein, E. M., McConlogue, L., Tan, H., Power, M., Masliah, E., and Mucke, L. (1995). "Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease." *J Biol Chem*, 270(47), 28257-67.
- Roch, J. M., Masliah, E., Roch-Levecq, A. C., Sundsmo, M. P., Otero, D. A., Veinbergs, I., and Saitoh, T. (1994). "Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(16), 7450-4.
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., and et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." *Nature*, 376(6543), 775-8.
- Rosen, D. R., Martin-Morris, L., Luo, L. Q., and White, K. (1989). "A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7), 2478-82.
- Roses, A. D. (1994). "Apolipoprotein E affects the rate of Alzheimer disease expression: beta-amyloid burden is a secondary consequence dependent on APOE genotype and duration of disease." *J Neuropathol Exp Neurol*, 53(5), 429-37.
- Rosmarin, A. G., Caprio, D. G., Kirsch, D. G., Handa, H., and Simkevich, C. P. (1995). "GABP and PU.1 compete for binding, yet cooperate to increase CD18 (beta 2 leukocyte integrin) transcription." *J Biol Chem*, 270(40), 23627-33.
- Rustay, N. R., Cronin, E. A., Curzon, P., Markosyan, S., Bitner, R. S., Ellis, T. A., Waring, J. F., Decker, M. W., Rueter, L. E., and Browman, K. E. (2010). "Mice expressing the Swedish APP mutation on a 129 genetic background demonstrate consistent behavioral deficits and pathological markers of Alzheimer's disease." *Brain Res*, 1311, 136-47.
- Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., and Greengard, P. (2001). "The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement." *J Cell Biol*, 153(7), 1403-14.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science*, 239(4839), 487-91.
- Salbaum, J. M., Weidemann, A., Lemaire, H. G., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1988). "The promoter of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor gene." *EMBO J*, 7(9), 2807-13.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. . (1989). "Expression of Cloned Genes in Cultured Mammalian Cells", in F. M. Ford N., (ed.), *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuel, W., Terry, R. D., DeTeresa, R., Butters, N., and Masliah, E. (1994). "Clinical correlates of cortical and nucleus basalis pathology in Alzheimer dementia." *Arch Neurol*, 51(8), 772-8.

- Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1994). "Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons." *J Biol Chem*, 269(2), 1510-7.
- Santana, S., Recuero, M., Bullido, M. J., Valdivieso, F., and Aldudo, J. (2012). "Herpes simplex virus type I induces the accumulation of intracellular beta-amyloid in autophagic compartments and the inhibition of the non-amyloidogenic pathway in human neuroblastoma cells." *Neurobiol Aging*, 33(2), 430 e19-33.
- Savoysky, E., Mizuno, T., Sowa, Y., Watanabe, H., Sawada, J., Nomura, H., Ohsugi, Y., Handa, H., and Sakai, T. (1994). "The retinoblastoma binding factor 1 (RBF-1) site in RB gene promoter binds preferentially E4TF1, a member of the Ets transcription factors family." *Oncogene*, 9(7), 1839-46.
- Sawada, J., Goto, M., Sawa, C., Watanabe, H., and Handa, H. (1994). "Transcriptional activation through the tetrameric complex formation of E4TF1 subunits." *EMBO J*, 13(6), 1396-402.
- Schedl, A., Beermann, F., Thies, E., Montoliu, L., Kelsey, G., and Schutz, G. (1992). "Transgenic mice generated by pronuclear injection of a yeast artificial chromosome." *Nucleic Acids Res*, 20(12), 3073-7.
- Schedl, A., Larin, Z., Montoliu, L., Thies, E., Kelsey, G., Lehrach, H., and Schutz, G. (1993a). "A method for the generation of YAC transgenic mice by pronuclear microinjection." *Nucleic Acids Res*, 21(20), 4783-7.
- Schedl, A., Montoliu, L., Kelsey, G., and Schutz, G. (1993b). "A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice." *Nature*, 362(6417), 258-61.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., and Younkin, S. (1996). "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease." *Nat Med*, 2(8), 864-70.
- Schlessinger, D. (1990). "Yeast artificial chromosomes: tools for mapping and analysis of complex genomes." *Trends Genet*, 6(8), 248, 255-8.
- Schmechel, D. E., Goldgaber, D., Burkhart, D. S., Gilbert, J. R., Gajdusek, D. C., and Roses, A. D. (1988). "Cellular localization of messenger RNA encoding amyloid-beta-protein in normal tissue and in Alzheimer disease." *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2(2), 96-111.
- Schmid, C. W., and Deininger, P. L. (1975). "Sequence organization of the human genome." *Cell*, 6(3), 345-58.
- Scholtzova, H., Wadghiri, Y. Z., Douadi, M., Sigurdsson, E. M., Li, Y. S., Quartermain, D., Banerjee, P., and Wisniewski, T. (2008). "Memantine leads to behavioral improvement and amyloid reduction in Alzheimer's-disease-model transgenic mice shown as by micromagnetic resonance imaging." *J Neurosci Res*, 86(12), 2784-91.
- Schubert, D., Jin, L. W., Saitoh, T., and Cole, G. (1989). "The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion." *Neuron*, 3(6), 689-94.
- Seabrook, G. R., and Rosahl, T. W. (1999). "Transgenic animals relevant to Alzheimer's disease." *Neuropharmacology*, 38(1), 1-17.
- Selkoe, D. J. (1991). "The molecular pathology of Alzheimer's disease." *Neuron*, 6(4), 487-98.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Da Silva, H. A., Haines, J. L., Perkicak-Vance, M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M., and St George-Hyslop, P. H. (1995). "Cloning of a gene

- bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature*, 375(6534), 754-60.
- Shioi, J., Pangalos, M. N., Ripellino, J. A., Vassilacopoulou, D., Mytilineou, C., Margolis, R. U., and Robakis, N. K. (1995). "The Alzheimer amyloid precursor proteoglycan (appican) is present in brain and is produced by astrocytes but not by neurons in primary neural cultures." *J Biol Chem*, 270(20), 11839-44.
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics*, 122(1), 19-27.
- Silver, L. M. (1995). *Mouse Genetics: Concepts and Applications*: Oxford University Press.
- Small, D. H., Mok, S. S., and Bornstein, J. C. (2001). "Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom." *Nat Rev Neurosci*, 2(8), 595-8.
- Smith, G. (1988). "Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation." *Brain Res*, 472(2), 103-18.
- Smith, M. A., Kalaria, R. N., and Perry, G. (1993). "Alpha 1-trypsin immunoreactivity in Alzheimer disease." *Biochem Biophys Res Commun*, 193(2), 579-84.
- Snow, A. D., Mar, H., Nochlin, D., Kimata, K., Kato, M., Suzuki, S., Hassell, J., and Wight, T. N. (1988). "The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease." *Am J Pathol*, 133(3), 456-63.
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C. L., Muller, U., Kins, S., and Beyreuther, K. (2005). "Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion." *EMBO J*, 24(20), 3624-34.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J Mol Biol*, 98(3), 503-17.
- Spencer, F., Hugerat, Y., Simchen, G., Hurko, O., Connelly, C., and Hieter, P. (1994). "Yeast kar1 mutants provide an effective method for YAC transfer to new hosts." *Genomics*, 22(1), 118-26.
- Spillantini, M. G., Goedert, M., Crowther, R. A., Murrell, J. R., Farlow, M. R., and Ghetti, B. (1997). "Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8), 4113-8.
- Squire, L. R., Wixted, J. T., and Clark, R. E. (2007). "Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective." *Nat Rev Neurosci*, 8(11), 872-83.
- Srivastava, A. K., and Schlessinger, D. (1991). "Vectors for inserting selectable markers in vector arms and human DNA inserts of yeast artificial chromosomes (YACs)." *Gene*, 103(1), 53-9.
- St George-Hyslop, P. H., Tanzi, R. E., Polinsky, R. J., Haines, J. L., Nee, L., Watkins, P. C., Myers, R. H., Feldman, R. G., Pollen, D., Drachman, D., and et al. (1987). "The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21." *Science*, 235(4791), 885-90.
- Strauss, W. M., Dausman, J., Beard, C., Johnson, C., Lawrence, J. B., and Jaenisch, R. (1993). "Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine alpha 1(I) collagen locus." *Science*, 259(5103), 1904-7.
- Strittmatter, W. J., and Roses, A. D. (1995). "Apolipoprotein E and Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11), 4725-7.
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., and Roses, A. D. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5), 1977-81.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P. A., Waridel, C., Calhoun, M. E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M., and Sommer, B. (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 13287-92.

- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Golde, T. E., and Younkin, S. G. (1994). "An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants." *Science*, 264(5163), 1336-40.
- Tagawa, K., Maruyama, K., and Ishiura, S. (1992). "Amyloid beta/A4 precursor protein (APP) processing in lysosomes." *Ann N Y Acad Sci*, 674, 129-37.
- Takeuchi, A., Irizarry, M. C., Duff, K., Saido, T. C., Hsiao Ashe, K., Hasegawa, M., Mann, D. M., Hyman, B. T., and Iwatsubo, T. (2000). "Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid beta precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss." *Am J Pathol*, 157(1), 331-9.
- Tanaka, S., Nakamura, S., Ueda, K., Kameyama, M., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., and Ito, H. (1988). "Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease." *Biochem Biophys Res Commun*, 157(2), 472-9.
- Tanaka, S., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H., Kameyama, M., Kimura, J., Nakamura, S., and Ueda, K. (1989). "Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain." *Biochem Biophys Res Commun*, 165(3), 1406-14.
- Tang, K., Wang, C., Shen, C., Sheng, S., Ravid, R., and Jing, N. (2003). "Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639." *Eur J Neurosci*, 18(1), 102-8.
- Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M., and Neve, R. L. (1987). "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus." *Science*, 235(4791), 880-4.
- Tarailo-Graovac, M., and Chen, N. (2009). "Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences." *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 4, Unit 4 10.
- Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Chui, D. H., Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, K., Murayama, M., Ishiguro, K., Planel, E., Sato, S., Hashikawa, T., and Takashima, A. (2002). "Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21), 13896-901.
- Terry, R. D. (1963). "The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease." *J Neuropathol Exp Neurol*, 22, 629-42.
- Terwel, D., Lasrado, R., Snauwaert, J., Vandeweert, E., Van Haesendonck, C., Borghgraef, P., and Van Leuven, F. (2005). "Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice." *J Biol Chem*, 280(5), 3963-73.
- Tesseur, I., Van Dorpe, J., Spittaels, K., Van den Haute, C., Moechars, D., and Van Leuven, F. (2000). "Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice." *Am J Pathol*, 156(3), 951-64.
- Thompson, C. C., Brown, T. A., and McKnight, S. L. (1991). "Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex." *Science*, 253(5021), 762-8.
- Trapp, B. D., and Hauer, P. E. (1994). "Amyloid precursor protein is enriched in radial glia: implications for neuronal development." *J Neurosci Res*, 37(4), 538-50.
- Trejo, J., Massamiri, T., Deng, T., Dewji, N. N., Bayney, R. M., and Brown, J. H. (1994). "A direct role for protein kinase C and the transcription factor Jun/AP-1 in the regulation of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein gene." *J Biol Chem*, 269(34), 21682-90.
- Trinchese, F., Fa, M., Liu, S., Zhang, H., Hidalgo, A., Schmidt, S. D., Yamaguchi, H., Yoshii, N., Mathews, P. M., Nixon, R. A., and Arancio, O. (2008). "Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease." *J Clin Invest*, 118(8), 2796-807.

- Tybulewicz, V. L., Crawford, C. E., Jackson, P. K., Bronson, R. T., and Mulligan, R. C. (1991). "Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene." *Cell*, 65(7), 1153-63.
- Urbanc, B., Cruz, L., Le, R., Sanders, J., Ashe, K. H., Duff, K., Stanley, H. E., Irizarry, M. C., and Hyman, B. T. (2002). "Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), 13990-5.
- Van Dam, D., D'Hooge, R., Staufenbiel, M., Van Ginneken, C., Van Meir, F., and De Deyn, P. P. (2003). "Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition." *Eur J Neurosci*, 17(2), 388-96.
- van den Hurk, W. H., Bloemen, M., and Martens, G. J. (2001). "Expression of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein APP in *Xenopus laevis*." *Brain Res Mol Brain Res*, 97(1), 13-20.
- Vassar, R. (2001). "The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci*, 17(2), 157-70.
- Vassar, R. (2004). "BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci*, 23(1-2), 105-14.
- Vassaux, G., and Huxley, C. (1997). "A dicistronic construct allows easy detection of human CFTR expression from YAC DNA in human cells." *Nucleic Acids Res*, 25(20), 4167-8.
- Venezia, V., Russo, C., Repetto, E., Salis, S., Dolcini, V., Genova, F., Nizzari, M., Mueller, U., and Schettini, G. (2004). "Apoptotic cell death influences the signaling activity of the amyloid precursor protein through ShcA and Grb2 adaptor proteins in neuroblastoma SH-SY5Y cells." *J Neurochem*, 90(6), 1359-70.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al. (2001). "The sequence of the human genome." *Science*, 291(5507), 1304-51.
- Vollrath, D., Davis, R. W., Connelly, C., and Hieter, P. (1988). "Physical mapping of large DNA by chromosome fragmentation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(16), 6027-31.
- Vostrov, A. A., Quitschke, W. W., Vidal, F., Schwarzman, A. L., and Goldgaber, D. (1995). "USF binds to the APB alpha sequence in the promoter of the amyloid beta-protein precursor gene." *Nucleic Acids Res*, 23(14), 2734-41.
- Vostrov, A. A., Taheny, M. J., Izkhakov, N., and Quitschke, W. W. (2010). "A nuclear factor-binding domain in the 5'-untranslated region of the amyloid precursor protein promoter: implications for the regulation of gene expression." *BMC Res Notes*, 3, 4.
- Wada, M., Ihara, Y., Tatsuka, M., Mitsui, H., Kohno, K., Kuwano, M., and Schlessinger, D. (1994). "HPRT yeast artificial chromosome transfer into human cells by four methods and an involvement of homologous recombination." *Biochem Biophys Res Commun*, 200(3), 1693-700.

- Walsh, D. M., and Selkoe, D. J. (2007). "A beta oligomers - a decade of discovery." *J Neurochem*, 101(5), 1172-84.
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., and Selkoe, D. J. (2000). "The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain." *Biochemistry*, 39(35), 10831-9.
- Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). "Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease." *Nat Med*, 2(8), 871-5.
- Watanabe, H., Imai, T., Sharp, P. A., and Handa, H. (1988). "Identification of two transcription factors that bind to specific elements in the promoter of the adenovirus early-region 4." *Mol Cell Biol*, 8(3), 1290-300.
- Watanabe, H., Sawada, J., Yano, K., Yamaguchi, K., Goto, M., and Handa, H. (1993). "cDNA cloning of transcription factor E4TF1 subunits with Ets and notch motifs." *Mol Cell Biol*, 13(3), 1385-91.
- Watanabe, H., Wada, T., and Handa, H. (1990). "Transcription factor E4TF1 contains two subunits with different functions." *EMBO J*, 9(3), 841-7.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P., Eyraas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., et al. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." *Nature*, 420(6915), 520-62.
- Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1989). "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein." *Cell*, 57(1), 115-26.
- Westerman, M. A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Carlson, G. A., Younkin, S. G., and Ashe, K. H. (2002). "The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci*, 22(5), 1858-67.
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., and Delon, M. R. (1982). "Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain." *Science*, 215(4537), 1237-9.
- Whitelaw, C. B., Springbett, A. J., Webster, J., and Clark, J. (1993). "The majority of G0 transgenic mice are derived from mosaic embryos." *Transgenic Res*, 2(1), 29-32.
- Wilcock, D. M., Rojiani, A., Rosenthal, A., Levkowitz, G., Subbarao, S., Alamed, J., Wilson, D., Wilson, N., Freeman, M. J., Gordon, M. N., and Morgan, D. (2004). "Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition." *J Neurosci*, 24(27), 6144-51.
- Williams, T., and Tjian, R. (1991). "Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2." *Genes Dev*, 5(4), 670-82.
- Winkler, D. T., Bondolfi, L., Herzig, M. C., Jann, L., Calhoun, M. E., Wiederhold, K. H., Tolnay, M., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (2001). "Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy." *J Neurosci*, 21(5), 1619-27.

- Wischik, C. M., Novak, M., Edwards, P. C., Klug, A., Tichelaar, W., and Crowther, R. A. (1988a). "Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(13), 4884-8.
- Wischik, C. M., Novak, M., Thogersen, H. C., Edwards, P. C., Runswick, M. J., Jakes, R., Walker, J. E., Milstein, C., Roth, M., and Klug, A. (1988b). "Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(12), 4506-10.
- Wisniewski, T., Palha, J. A., Ghiso, J., and Frangione, B. (1995). "S182 protein in Alzheimer's disease neuritic plaques." *Lancet*, 346(8986), 1366.
- Wood, J. G., Mirra, S. S., Pollock, N. J., and Binder, L. I. (1986). "Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau)." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(11), 4040-3.
- Xu, H., Greengard, P., and Gandy, S. (1995). "Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein." *J Biol Chem*, 270(40), 23243-5.
- Yang, Y., Quitschke, W. W., Vostrov, A. A., and Brewer, G. J. (1999). "CTCF is essential for up-regulating expression from the amyloid precursor protein promoter during differentiation of primary hippocampal neurons." *J Neurochem*, 73(6), 2286-98.
- Ye, S., Huang, Y., Mullendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E. C., Cohen, F. E., Kuntz, I. D., Weisgraber, K. H., and Mahley, R. W. (2005). "Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(51), 18700-5.
- Yokomori, N., Kobayashi, R., Moore, R., Sueyoshi, T., and Negishi, M. (1995). "A DNA methylation site in the male-specific P450 (Cyp 2d-9) promoter and binding of the heteromeric transcription factor GABP." *Mol Cell Biol*, 15(10), 5355-62.
- Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). "Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene." *Gene*, 87(2), 257-63.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Hopkins, R., Sirinathsinghji, D. J., Stevens, K. A., Conner, M. W., Slunt, H. H., Sisodia, S. S., Chen, H. Y., and Van der Ploeg, L. H. (1996). "Mice deficient for the amyloid precursor protein gene." *Ann N Y Acad Sci*, 777, 421-6.
- Zurita, E., Chagoyen, M., Cantero, M., Alonso, R., Gonzalez-Neira, A., Lopez-Jimenez, A., Lopez-Moreno, J. A., Landel, C. P., Benitez, J., Pazos, F., and Montoliu, L. (2011). "Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains." *Transgenic Res*, 20(3), 481-9.

ANEXOS

ANEXO 1

Platones donadores de oocitos	YAC	Tamaño (kb)	Hembras superovuladas (SD)	Hembras con tapón vaginal (% SD)	Oocitos fecundados obtenidos (oocitos/hembra con tapón vaginal)	Oocitos fecundados microinyectados (% recuperados)	Embriones transferidos (% microinyectados)	Hembras pseudogestantes utilizadas (embriones/hembra)	Hembras gestantes y a término (% pseudogestantes)	Crías nacidas (% embriones transferidos)	Transgénicos identificados (% crías)	Transgénicos con el YAC intacto (% crías transgénicas)
B6CBAF1/OlaHsd	APPwt	565	6	3 (50)	239 (80)	114 (48)	69 (61)	3 (23)	3 (100)	9 (13)	0 (0)	-
			6	3 (50)	131 (44)	86 (66)	62 (72)	3 (21)	0 (0)	-	-	-
			6	3 (50)	179 (60)	55 (31)	29 (53)	1 (29)	0 (0)	-	-	-
			6	4 (67)	236 (59)	158 (67)	90 (57)	4 (22)	3 (75)	14 (16)	0 (0)	-
			6	4 (67)	182 (45)	121 (66)	91 (75)	4 (23)	3 (75)	15 (16)	0 (0)	-
			4	2 (50)	118 (59)	73 (62)	43 (59)	2 (21)	2 (100)	16 (37)	0 (0)	-
			6	3 (50)	214 (71)	167 (78)	112 (67)	5 (22)	5 (100)	34 (30)	2 (6)	0 (0)
			6	3 (50)	133 (44)	64 (48)	42 (66)	2 (21)	2 (100)	10 (24)	1 (10)	0 (0)
			8	6 (75)	228 (38)	128 (56)	98 (77)	4 (24)	4 (100)	29 (30)	2 (7)	2 (100)
			54	31 (57)	1660 (54)	966 (58)	636 (66)	28 (23)	22 (79)	127 (20)	5 (4)	2 (40)

Tabla R.1. Datos de las diferentes sesiones de microinyección del YAC APPwt.

ANEXO 2

Clon célula ES (Genotipo)	YAC	Tamaño (kb)	Donantes (hembras con tapón vaginal) Cepa de ratón	Blastocistos inyectados	células ES 25 inyectadas por blastocisto	Embriones transferidos (% inyectados)	Crías nacidas (% embriones transferidos)	Quimeras (% crías)	Sexo quimera (% aproximado contribución al color del pelaje)	Nº quimera y transmisión a la línea germinal: pigmentación (crías PG/crías totales)	Transmisión a la línea germinal: YAC (TG/crías PG)	Patrón de herencia (test ji cuadrado)%
Clon ES 25 (C57BL/6J)	APPwt	565	12 (11) B6 albino	62	6-10	62 (100)	3 (5)	0 (0)	-	-	-	-
			7 (6) B6 albino	29	5	29 (100)	9 (31)	2 (22)	1 M (30); 1 H (30)	9114: Sí (23/24); 9117: No (0/22)	Sí (10/23)	Mendeliano
			6 (4) B6 albino	20	5	20 (100)	6 (30)	1 (17)	1 H (40)	9118: No (0/16)	-	-
			8 (6) B6 albino	34	5	34 (100)	10 (29)	3 (30)	1 M (10); 1 M (60); 1 H (30)	9115: No (0/28); 9116: Sí (13/14); 9119: No (0/13)	Sí (8/13)	Mendeliano
Clon Es 25 (C57BL/6J)	APPwt	565	33 (27) B6 albino	145	5	145 (100)	28 (19)	6 (21)				

Tabla R.4. Datos de las diferentes sesiones de inyección de las células ES 25 y generación de ratones quiméricos.

ANEXO 3

Patrones donadores de oocitos	YAC	Tamaño (kb)	Hembras superovuladas (SU)	Hembras con tapón vaginal (% SU)	Oocitos fecundados obtenidos (oocitos/hembra con tapón vaginal)	Oocitos fecundados microinyectados (% recuperados)	Embriones transferidos (% microinyectados)	Hembras pseudogestantes utilizadas (embriones/hembra)	Hembras gestantes y a término (% pseudogestantes)	Crias nacidas (% embriones transferidos)	Transgénicos identificados (% crias)	Transgénicos con el YAC intacto (% crias transgénicas)
B6CBAF1/OlaHsd	APP ^{swe}	565	6	6 (100)	150 (25)	118 (79)	66 (56)	3 (22)	2 (67)	4 (6)	0 (0)	-
			6	3 (50)	128 (43)	41 (32)	30 (75)	1 (30)	0 (0)	-	-	-
			6	3 (50)	36 (12)	0 (0)	-	-	-	-	-	-
			6	2 (33)	185 (92)	44 (24)	39 (89)	2 (19)	2 (100)	10 (26)	0 (0)	-
			6	4 (67)	119 (30)	92 (77)	78 (85)	3 (26)	3 (100)	12 (15)	0 (0)	-
			6	2 (33)	220 (110)	34 (15)	25 (74)	1 (25)	0 (0)	-	-	-
			6	4 (67)	140 (35)	79 (56)	62 (78)	3 (21)	0 (0)	-	-	-
			6	4 (67)	146 (36)	87 (60)	67 (77)	3 (22)	3 (100)	14 (21)	0 (0)	-
			6	6 (100)	270 (45)	115 (43)	80 (70)	4 (20)	0 (0)	-	-	-
			5	2 (33)	229 (114)	105 (46)	81 (77)	5 (16)	5 (100)	23 (28)	7 (30)	2 (29)
			5	4 (67)	122 (30)	87 (71)	70 (80)	3 (23)	3 (100)	8 (11)	2 (25)	1 (50)
			5	4 (67)	148 (37)	93 (63)	84 (90)	4 (21)	4 (100)	24 (29)	1 (4)	0 (0)
B6CBAF1/OlaHsd	APP ^{swe}	565	69	44 (64)	1893 (43)	895 (47)	682 (76)	32 (21)	21 (66)	95 (14)	10 (11)	3 (30)

Tabla R.5. Datos de las diferentes sesiones de microinyección del YAC APP^{swe}.

Chapter 8

Generation of Transgenic Animals by Use of YACs

Almudena Fernández, Diego Muñoz, and Lluís Montoliu

Abstract

The use of genomic-type DNA constructs ensures optimal transgene expression, once inserted into the host genome, because their large size includes most if not all the regulatory elements that are needed for correct gene expression. Large heterologous DNA molecules can be easily manipulated in bacterial or yeast cells, through the use of bacterial artificial chromosomes (BACs) or yeast artificial chromosomes (YACs), respectively. YACs are the vectors that allow the manipulation of larger DNA molecules, in excess of 1 Mb (1,000 kb). Some mammalian loci (i.e., the APP locus, ~450 kb) greatly exceed the maximum size for inserts that can be accommodated by BACs. Therefore YACs are currently the only available robust and reliable solution for working with these large genes. In this chapter, we will describe several procedures directed towards the preparation of YAC DNA of a quality suitable for microinjection into mouse embryos, for the successful generation of transgenic mice.

Abbreviations

AHM	Acid hydrolyzed casein
BAC	Bacterial artificial chromosome
ddH ₂ O	Double distilled water
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ES	Embryonic stem cell
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
LMP	Low-melting point
Mb	Megabase (= 1,000 kilobases)
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Single nucleotide polymorphism
TAE	Buffer solution containing a mixture of Tris base, acetic acid and EDTA
TBE	Buffer solution containing a mixture of Tris base, boric acid and EDTA
YAC	Yeast artificial chromosome

8.1 Introduction

The use of very large genomic pieces of DNA, in the form of YACs or BACs, has become increasingly popular for the generation of transgenic animals, because their size usually includes all regulatory elements needed for specific expression domains to function correctly in an ectopic genomic location [1]. YACs exist mostly as linear molecules, although circular versions can be prepared, and carry specific auxotrophic gene markers for selection purposes in haploid yeast cells. The size of heterologous DNA cloned into YACs may vary from a few kilobases (i.e., 35 kb [2]) to more than 2 Mb (i.e., 2.4 Mb [3]). YACs are maintained as the 17th chromosome within 16 chromosome yeast cells, due to the functional elements included in their vector arms, such as a centromere, autonomous replicating sequences and telomeres. All these elements do not function within a mammalian cell and, hence, YACs need to be integrated into the host genome to be expressed adequately. However, the expression of genes within YACs does not appear to be influenced by vector sequences [4–6] and normally reach an expression level similar to that of their corresponding endogenous loci [1]. In particular, transgene expression obtained from a YAC-based approach would normally be better than plasmid-based strategies [7]. Transgenic animals carrying YAC transgenes with optimal expression levels have been obtained in several mammalian species, including mice ([4, 5]; reviewed in [1, 8]), rats [9–11], rabbits [12] and pigs [13]. Preliminary attempts have also been reported in goats [14]. Transgenic mice generated with YAC constructs have been instrumental for the production of new animal models of Alzheimer disease, overexpressing the large human APP locus [15, 16], or for producing human antibodies in mice, through the manipulation of large human chromosomal fragments harboring the immunoglobulin loci [17–19].

YACs can sometimes be of a similar size as any of the endogenous 16 yeast chromosomes, thereby co-migrating or closely migrating in pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and making impossible the isolation of the YAC DNA molecule without co-isolation of a given yeast chromosome. Although some studies have shown that the co-integration of contaminating endogenous yeast chromosomes does not seem to impair the expression of YAC transgenes (i.e., transfer of YAC DNA to mouse embryonic stem (ES) cells by spheroplast cell fusion: [17], [40], [20]), it is always preferable to microinject YAC DNA samples free of contaminating yeast chromosomes [1]. The problem of YACs co-migrating with other yeast chromosomes can be easily solved by the use of yeast window strains, which carry defined alterations in

their karyotype and result in areas of the PFGE free of endogenous yeast chromosomes [41]. Purified YAC DNA samples can also be transfected into mammalian cells (i.e., mouse ES cells) by the use of lipofection procedures [21–23].

The addition of polyamines (spermidine and spermine) to the microinjection buffer, in the presence of high salt (100 mM NaCl) appears to be essential for keeping the DNA intact, for the prevention from shearing, and hence, for the successful generation of both YAC and BAC transgenic mice, carrying intact constructs [24–26]. The combined presence of polyamines and high salt leads to compaction of YAC DNA molecules, which are stabilized and protected, in the form of globular structures, which can be directly observed by electron microscopy [25]. In the presence of high-salt buffers, polyamines and DNA molecules form intramolecular aggregates which help to keep these large constructs intact. Without polyamines, complex intermolecular aggregates may be formed. This may result in the breakage of DNA molecules when microinjection of these suboptimal transgene samples takes place [25].

The efficiency of transgenic mouse production using YAC DNA may be lower (1–5% of newborn pups) compared to plasmid-based DNA fragments (5–10%). However, compared to plasmid-based DNA, the variability between individual YAC constructs and between YAC DNA preparations for the same construct is increased. These variations are mostly attributable to the quality of the YAC DNA preparation, which may retain a higher level of co-purified contaminants. This results in poor embryo survival after microinjection and hence, poor transgenic results, including less pups born and a lower percentage of these pups being transgenic [1].

Higher efficiencies can be achieved by intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-mediated YAC DNA transgenesis [27, 28], where 10–35% YAC transgenic mice have been reported among newborns. The ICSI adapted procedure for delivering YAC DNA in association with sperm heads into unfertilized oocytes has been described in great detail [29]. However, ICSI-mediated procedures may result in a higher proportion of fragmented YACs integrated into the host genome, compared to standard microinjection methods. In contrast, nearly all YAC transgenic mice generated by ICSI-mediated microinjection appear to be non-mosaic and transmit the transgene to the progeny at Mendelian ratios. By comparison, a majority of transgenic mouse founders generated through standard pronuclear microinjection methods, including YAC DNA microinjection, are mosaics [5, 30, 31].

Due to the large size of the YAC DNA molecules and the molarity of the YAC DNA samples, microinjection will result in the introduction of a small number of DNA molecules into the pronucleus of fertilized mouse eggs. Using the appropriate

conversion factors and Avogadro's number, about 400 DNA molecules would be microinjected for a standard small DNA construct, 5 kb in size, at a DNA concentration of 1 ng/ μ l, with a delivered volume of 2 pl into the mouse oocyte pronucleus. Equivalent calculations for a solution of YAC DNA, 500 kb in size, at the same concentration and with the same delivered volume, will result in only about four molecules being microinjected. Surprisingly, although the overall transgenesis efficiency is lower with YACs, compared to standard smaller DNA molecules, clearly it is not 100 times lower, as we might expect, given the calculation above. It is tempting to speculate that the presence of repeated sequences (yeast telomeres) at either end of the YAC DNA molecule might render them more "attractive" to the endogenous integration machinery.

Usually, YAC transgenic mice carry one or very few copies integrated (1–5) [1]. Rarely, they carry more than five copies integrated into one single locus. The integrity of the YAC DNA transgene should be addressed and confirmed using a variety of methods, including systematic genotyping across the entire YAC DNA molecule (with several PCR reactions) and/or the use of known genetic polymorphisms (RFLPs, SNPs). Standard Southern-blot [4] and fingerprint analyses [17] should also be carried out, to verify the integrity of the YAC transgene. Eventually, the co-segregation of several independent markers across the YAC DNA molecule among the F1 progeny will be an additional proof of the linked co-integration of the YAC transgene.

YAC DNA solutions can be maintained at 4°C and should never be frozen, because the YACs will shear into smaller DNA molecules. YAC DNA solutions should be freshly prepared as close to the microinjection session as possible, and microinjected within the following 2 months. In order to avoid breaking these large DNA molecules, pipetting of YAC DNA solutions should be always carried out with utmost care, proceeding slowly and using cut-off tips, to enlarge the opening of the tip and thus avoid breaking these large DNA molecules. Vortex or intense agitation should never be applied to YAC DNA solutions. Wear gloves all the time to avoid contamination of the YAC DNA samples with nucleases, which would quickly digest and degrade the YAC DNA sample.

YAC DNA solutions cannot be concentrated by standard DNA precipitation methods and resuspended into smaller volumes, as would be the case for smaller DNA plasmid-type molecules. Attempting to precipitate YAC DNA solutions will result, unavoidably, in the destruction of the YAC DNA molecules. Therefore, in order to keep the molecules intact, YAC DNA must be obtained and stored, always, in agarose plugs, or in solution, preserved with high salt and polyamines.

During microinjection of YAC DNA samples into the pronucleus of fertilized mouse oocytes, the inner diameter of the microinjection needle tip should be slightly larger (i.e., tip can be carefully broken by touching the holding needle) than for plasmid-based DNA fragments. The injection pressure should be kept as low and, most importantly, as constant as possible, to avoid shearing of these large DNA molecules upon exposure to extreme pressure changes during the procedure. This is best achieved by the use of automated microinjection devices (i.e., Femtojet, Eppendorf).

Purification of YAC DNA begins with the large-scale preparation of yeast agarose plugs carrying the YAC DNA molecules, followed by a PFGE step and a subsequent concentration step, which can be achieved through a second standard agarose electrophoresis gel or by the use of ultrafiltration units. The essential protocol has been outlined before [32–35] and should produce enough YAC DNA of a quality suitable for microinjection purposes. Next, we will describe and comment upon the main procedure itself and alternative methods for preparation of YAC DNA of a quality suitable for the generation of transgenic mice.

8.2 Equipment

Agarose block formers (plug molds, GE Healthcare Life Sciences).

Medium-size centrifuge (for 50-ml plastic tubes).

Centrifuge for 1.5-ml Eppendorf tubes.

Flask, 1-l.

Hemocytometer.

Water bath, 37–40°C.

Eppendorf tube, 1.5 ml.

Falcon tubes, 50 ml.

Pipette tips, cut-off, yellow tips (200 µl) and blue tips (1,000 µl).

PFGE comb with preparative slot in center.

Millipore dialysis filter (Millipore VMWP02500, pore size 0.05 µm).

Millipore flat forceps (for handling dialysis filters).

Millipore ultrafiltration unit (Millipore Ultrafree MC 30,000 NMWL UFC3 TTK 00).

Petri dishes, 10 cm diameter.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) apparatus (i.e., Gene Navigator [GE Healthcare Life Sciences] or CHEF DR [Bio-Rad]).

Standard horizontal gel electrophoresis apparatus (for DNA).

Plastic ruler.

Scalpel (sterile, single use).

UV light transilluminator.

Water bath or hot block, 40–65°C.

Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific) or fluorometer.

8.3 Reagents and Solutions

Overnight yeast culture carrying the YAC of interest

Selection medium for YACs (i.e., AHC or drop-out medium, depending on the yeast strain)

ddH₂O sterile, MilliQ grade (embryo-tested)

EDTA 500 mM (pH 8.0) and also 50 mM (pH 8.0)

NaCl 5 M

Tris-HCl 1 M (pH 7.5)

Agarose SeaPlaque LMP GTG (Lonza)

Agarose NuSieve LMP GTG (Lonza)

Gelase (Epicentre) or Agarase (New England Biologicals)

Lambda (λ) DNA multimers (New England Biologicals or Roche)

PFGE yeast chromosome markers (Roche)

Solution I

~1 M Sorbitol (Merck, autoclaved)

20 mM EDTA (pH 8.0) (autoclaved)

14 mM β-mercaptoethanol (Merck)

2 mg/ml Zymolyase-20 T (MP Biomedicals catalog number 320921)

Sterile water

Prepare fresh, do not store

Solution II

~1 M Sorbitol (Merck, autoclaved)

20 mM EDTA (pH 8.0) (autoclaved)

2% SeaPlaque GTG LMP agarose (Lonza catalog number 50111)

14 mM β-mercaptoethanol (Merck)

Sterile water

Prepare fresh. Melt the Sorbitol plus EDTA and agarose in the microwave

Avoid boiling. Equilibrate in a water bath at 37–40°C
 Add the β -mercaptoethanol and keep the solution at 37–40°C
 until use

Solution III

~1 M Sorbitol (Merck, autoclaved)
 20 mM EDTA (pH 8.0) (autoclaved)
 10 mM Tris–HCl (pH 7.5) (autoclaved)
 14 mM β -mercaptoethanol (Merck)
 2 mg/ml Zymolyase-20 T (MP Biomedicals catalog number
 320921)
 Sterile water
 Prepare fresh, do not store

Solution IV

1% lithium dodecyl sulfate (Sigma L4632)
 100 mM EDTA (pH 8.0) (autoclaved)
 10 mM Tris–HCl (pH 8.0) (autoclaved)
 Sterile water
 Filter-sterilize (0.22 μ m). Store at room temperature

100% NDS buffer

500 mM EDTA

10 mM Tris base

34 mM N-laurylsarcosine

Mix 350 ml of water with 93 g of EDTA and 0.6 g of Tris base.
 Equilibrate to pH >8.0 with solid NaOH pellets. Add 5 g
 of N-laurylsarcosine (Sigma) pre-dissolved in 50 ml of water.
 Equilibrate to pH 9.0 with 10 M NaOH and bring the final
 volume to 500 ml with water. Filter-sterilize (0.22 μ m). Store
 at 4°C. The final concentration of NDS buffer is 20%.

YAC Equilibration buffer

1 \times TAE buffer

100 mM NaCl

0.030 mM Spermine (Sigma, tetrachloride, S1141)

0.070 mM Spermidine (Sigma, trihydrochloride, S2501)

Ethidium bromide (EtBr) staining solution

Add 50 μ l of 10 mg/ml EtBr stock solution per 1 l of 0.5 \times TBE
 PFGE running buffer

TBE buffer (used at 0.5×; stock solution is 10×)

10× stock solution: 890 mM Tris base, 890 mM Sodium Borate, 20 mM EDTA (pH 8.0)

TAE buffer (used at 0.25×, 0.5× and 1.0×; stock solution is prepared as 50×)

50× stock solution: 2,000 mM Tris acetate, 50 mM EDTA (pH 8.0)

1,000× Polyamine mix

30 mM Spermine (Sigma, tetrahydrochloride, S-1141)

70 mM Spermidine (Sigma, trihydrochloride, S-2501)

Working concentrations for 1× polyamines are 30 μM spermine and 70 μM spermidine, also known and called as 100 μM polyamines mix. Both reagents are dissolved together in sterile H₂O, filter sterilized (0.22 μm), stored in aliquots at −20°C and can be used with confidence for long periods of time (>1 year). The two polyamines are highly hygroscopic. Therefore, we recommend you to avoid weighing these compounds and, instead, order a defined amount (i.e., 1 g), do the required calculations and prepare the whole volume at once and combine in one single tube.

YAC Microinjection buffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

0.1 mM EDTA (pH 8.0)

100 mM NaCl

1× Polyamine mix

Aliquot, filter-sterilize (0.22 μm), and store the mixture (without polyamines) at 4°C for several months. The ready-to-use YAC microinjection buffer (polyamines added) should be prepared fresh for each experiment and should not be stored.

8.4 Preparation of YAC DNA for Microinjection Purposes

8.4.1. Large-Scale Preparation of Yeast Agarose Plugs for Isolation of YAC DNA

1. Inoculate 200 ml of appropriate selection medium for YACs with 1 ml of the corresponding yeast overnight culture in 1-l flask. Let the culture grow at 30°C with vigorous shaking (250 rpm) until saturation (1–2 days).
2. Count the number of yeast cells with a hemocytometer. A saturated yeast cell culture should contain between 0.75 and 1×10^8 yeast cells/ml.

3. Spin down the yeast cells in a 50-ml tube at 600 g for 5 min at room temperature. Discard the medium.
4. Resuspend and wash the cells in 50 mM EDTA (pH 8.0). Use 40 ml of this solution per 100 ml of original medium. Spin down the cells as in **step 3**. Repeat this washing step one more time with 20 ml of 50 mM EDTA (pH 8.0). Discard the medium. Additional washing steps can be included at will, in order to obtain cleaner yeast cell preparations. Failure to remove debris adequately will also impact in the quality of the final YAC DNA preparation. After each centrifugation step all remaining liquid should be removed. Last drops should be carefully aspirated. The procedure can be halted at this step and the yeast cells kept in 50 mM EDTA (pH 8.0) solution at 4°C until they can be processed. However, a drop in YAC DNA quality may occur if the unprocessed yeast cells are maintained for longer periods (>1 week) in this solution.
5. Weigh the yeast cell pellet (assuming a density of 1 g/ml and subtracting the weight of the plastic tube). The yeast cell pellet will weigh between 2.0 and 2.5 g.
6. Warm the yeast cell pellet at 37–40°C for 30 s in a water bath. Immediately add enough pre-warmed *Solution I* to give a final concentration of, approximately, 8×10^9 yeast cells/ml. Resuspend the cells by careful swirling. The volume of liquid added should be kept as small as possible, with a maximum being equal or similar to the volume of cells. For optimal results, add half of the volume of the yeast cell pellet (1–1.25 ml). However, irrespective of the volume used, the yeast cells should be adequately dispersed into this limited amount of liquid to achieve a homogeneous solution before proceeding to the next step.
7. Immediately add an equal volume of pre-warmed (37–40°C) *Solution II* and keep the tube in a water bath. Mix quickly, but gently, and pipette (use cut-off yellow tips) 80- μ l aliquots into agarose block formers (plug mold, Fig. 8.1a) previously

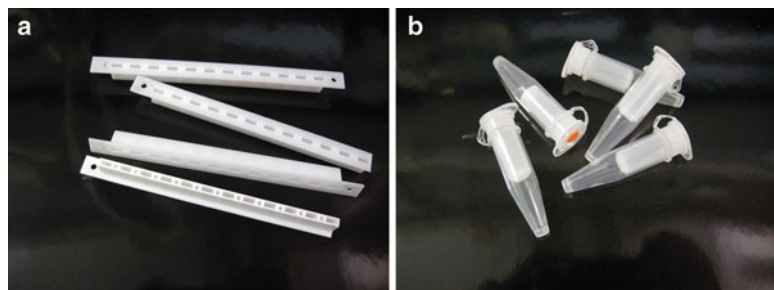


Fig. 8.1 (a) Agarose block formers (plug molds) [Gene Navigator System, GE Healthcare Life Sciences]. Picture by Lluís Montoliu. (b) Ultrafiltration units (Millipore). Picture by Lluís Montoliu.

bottom-sealed with tape and placed on ice. Proceed as quickly as possible and avoid trapping air bubbles in the plugs. Gently shake the tube with cells and agarose every 20 s in the water bath (37–40°C) to prevent too early solidification of the agarose, before pipetting is finished. This will make a final concentration of 4×10^9 yeast cells/ml of agarose plug.

8. Chill on ice for 10 min until the agarose plugs solidify.
9. Transfer the agarose plugs into *Solution III* for spheroplasting, using 8 ml of solution per ml of plug (according to the total volume obtained in **step 7**). Incubate at 37°C for 2–3 h with gentle agitation, in a water bath.
10. Decant *Solution III* and replace it with an identical volume of *Solution IV* (8 ml of solution per ml of plug). Continue the incubation at 37°C with gentle agitation for at least 1 h. Replace the buffer with fresh *Solution IV* and continue incubating overnight (>12 h, fine up to 24 h) at 37°C with gentle agitation.
11. On the next day, decant the buffer and wash the agarose plugs with 20% *NDS buffer* using the same volume as before (8 ml of buffer per ml of plug). Proceed for 2 h with gentle agitation at room temperature. Repeat this washing step two times. Agarose plugs can be loaded directly onto PFGE gels or stored indefinitely in this buffer at 4°C. Alternatively, agarose plugs can also be stored in 50 mM EDTA (pH 8) solution for longer periods of time.

8.4.2. Purification of YAC DNA with Two Gel Electrophoresis Steps

1. Cast a 1% agarose SeaPlaque GTG (Lonza) PFGE gel using $0.5 \times$ TBE as a buffer and a comb with a preparative slot in the center (~150 ml for the Gene Navigator casting gel set-up). The central preparative slot should be 4–5 cm wide, thus enabling loading 8–10 agarose plugs (Subheading 8.4.1).
2. Load the agarose plugs vertically and consecutively into the preparative slot (8–10 blocks, depending on the size of the slot), which should be centrally located (Fig. 8.2a–c). Include marker lanes on both sides with a very small slice (1/4 or 1/8) of the same batch of agarose plugs, and additional marker lanes with λ DNA multimers and/or known yeast chromosome PFGE markers.
3. Cover/seal all slots with 1% SeaPlaque GTG (FMC) LMP, let it solidify, and start the gel with appropriate running conditions to ensure optimal resolution in the desired chromosomal size range. The running buffer must be cooled to 10°C with the help of an external cooling device, to avoid aberrant DNA separation.

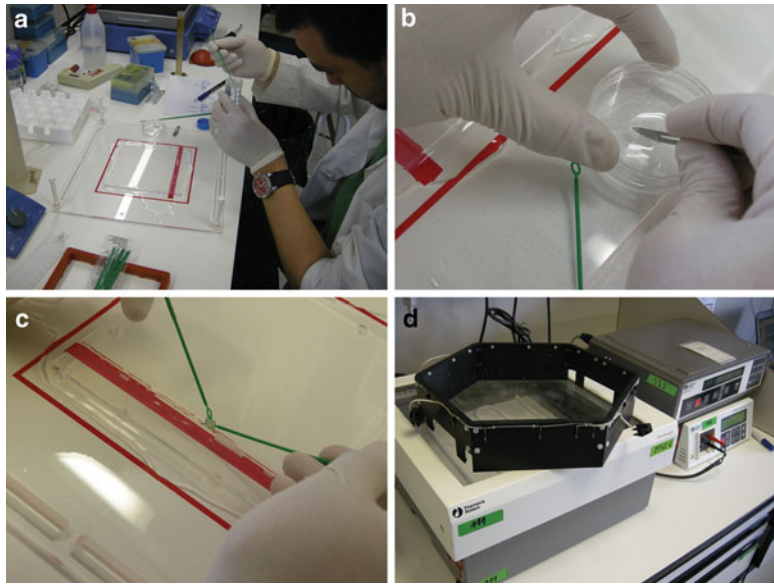


Fig. 8.2 (a) Retrieval of YAC DNA-containing agarose plugs from equilibrating buffer. The polymerized PFGE gel, wet with running buffer, on the table, is ready to be loaded. (b) Trimming the agarose plugs to prepare 1/4 and 1/8 slices for marker lanes, on a Petri dish, with a sterile scalpel. (c) Loading YAC DNA-containing agarose plugs into the PFGE gel using single-use sterile plastic inoculating loops. (d) Gene Navigator PFGE system (GE Healthcare Life Sciences). All pictures by Lluís Montoliu.

4. After the gel has run, cut-off marker lanes plus a small part of the preparative lane on either side and stain these two external parts with *EtBr staining solution* during 30 min with gentle shaking (Fig. 8.3a). The central part of the gel containing most of the preparative slot remains unstained in cold running buffer.
5. Using a UV transilluminator, mark the locations of the desired YAC chromosomal bands and two additional bands (usually the endogenous yeast chromosomes located above and below the YAC of interest) on the gel slices by cutting a nick with a scalpel.
6. Re-assemble the EtBr-stained and marked parts of the PFGE gel next to the preparative central lane and carefully cut out the YAC-containing agarose slice and the two additional slices containing endogenous yeast chromosomes using the marked nicks as a reference and a ruler as a guide. Aim to produce agarose slices no thicker than 5–6 mm. Then, remove the YAC DNA-containing and the endogenous yeast chromosome-containing slices and transfer them to different tubes with $1 \times$ TAE buffer. The rest of the PFGE gel can be now stained with *EtBr staining solution* to confirm that the desired YAC DNA and neighboring endogenous

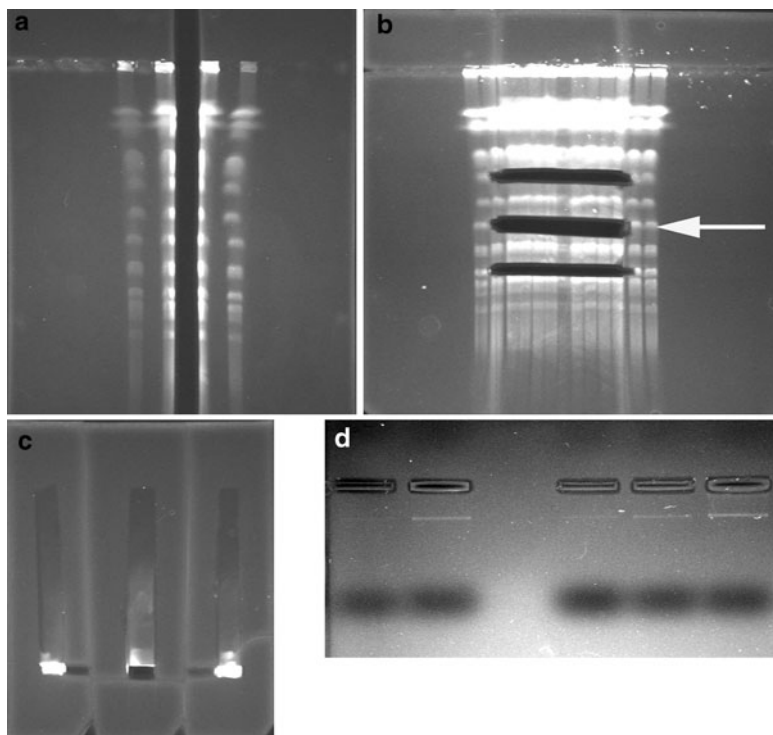


Fig. 8.3 (a) Side lanes of the first PFGE gel stained with EtBr solution. The central part, containing the preparatory slot and the desired YAC DNA, has been removed. (b) PFGE re-assembled, after staining also the central part and after having removed the agarose slices containing the YAC (indicated by an *arrow*) and neighboring endogenous chromosomal bands. (c) Second standard gel electrophoresis, stained with EtBr solution, both the central and side lanes. Please note a cube of agarose missing in the central part, corresponding to the location of the concentrated YAC DNA, after the second gel run. (d) Assessing the concentration of the YAC DNA stock solution by comparison to EtBr-stained YAC DNA bands of known concentration. *Left lanes*, 1 and 2 μ l of a new YAC DNA stock solution. *Right lanes*, 5, 10 and 20 ng of a control YAC DNA, previously obtained and quantified, as a reference.

chromosomal bands have been adequately cut out (Fig. 8.3b).

7. Equilibrate the three gel slices, including the YAC DNA slice, in $1 \times$ TAE buffer three times for 30 min each. At this step the agarose slices can be kept at 4°C and the protocol can be resumed within the next few days (but within 1 week).
8. For the second electrophoresis gel step, carefully position the gel slices on a minigel DNA electrophoresis tray (at 90° angle, in relation to the previous PFGE gel run, Fig. 8.4). Place the YAC-containing agarose slice in the middle surrounded by the two marker slices. The three agarose slices should be placed and aligned at the same level. Remove all drops of buffer with a tissue paper.

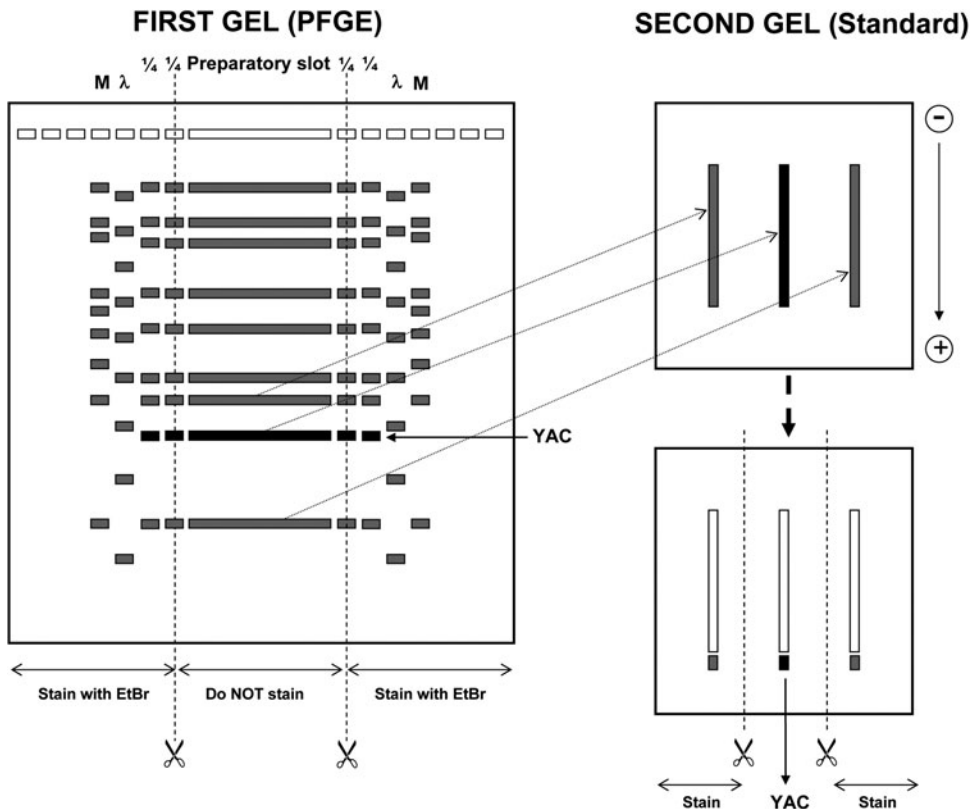


Fig. 8.4 Scheme illustrating the purification and concentration of YAC DNA using the two gels approach. First (*left*) the PFGE gel, then (*right*) the standard horizontal electrophoresis gel, shown before (*above*) and after the run (*below*), with the concentrated YAC DNA shown as a *black square*, indicated by an *arrow*.

9. Embed the gel slices in a 4% NuSieve GTG LMP (FMC) agarose gel in 1× TAE (approx. 50 ml) and run the gel for 6–9 h at 60–90 V.
10. After the gel run, cut-off one side of the gel and stain with *EtBr staining solution* for 30 min, as described in **step 4**. If the run is complete you should see all DNA from the long agarose slice being concentrated at the border and within the first 3–4 mm of the 4% NuSieve agarose gel. However, if DNA is still visible within the preparative PFGE slice, then the electrophoresis must proceed for a longer time. Then, you should use the other side for staining and visualizing.
11. Using the nicks of the marker lanes as a reference and a ruler remove the corresponding part of the central YAC-containing lane. Carefully transfer this gel slice (it should be a cube-shaped agarose portion) into a 15 ml plastic tube with 1× TAE buffer and keep it at 4°C. The rest of the gel can be stained now in EtBr staining solution to verify that all DNA has been cut out (Fig. 8.3c).

12. Wash and equilibrate the YAC DNA-containing gel slice, in fresh $1\times$ TAE buffer three times for 30 min each. At this step the agarose slice can be kept at 4°C and the protocol can be resumed within the next few days (but within 1 week).
13. Equilibrate the agarose gel cube containing YAC DNA in excess of freshly prepared *YAC equilibration buffer* (minimum 15 ml) for at least 2 h.
14. Transfer the YAC DNA gel slice onto a sterile surface (i.e., a sterile plastic Petri dish), and carefully remove all drops of equilibration buffer with the help of tissue paper. Be careful not to dry out the agarose gel cube.
15. Weigh the gel slice using a sterile Eppendorf tube (previously tared to zero).
16. Melt the agarose cube by placing the tube in a hot block or water bath for 10 min at 65°C .
17. Spin the tube in a microcentrifuge at top speed (10,600–20,800 g) for 5 s and place it back in a water bath set at 40°C for temperature equilibration (5–10 min).
18. Add 4–8 units of gelase/agarase per 100 mg of agarose gel cube to the tube containing the melted agarose. It is important to pre-warm the aliquot of the enzyme solution, kept at -20°C , to be added, first to room temperature and then to 40°C (i.e., place the yellow cut-off tip containing the gelase solution inside an open empty Eppendorf tube floating in a 40°C water bath for 15–30 s) to avoid immediate re-polymerization of the agarose gel upon contact.
19. Place the tube back in the 40°C water bath and let the gelase solution settle. After 5 min, gently pipette up and down two or three times with a cut-off blue-tipped pipette to start carefully mixing the gelase solution. Proceed with the digestion for 2–3 h at 40°C , mixing the sample gently every hour (pipetting up and down carefully and slowly with a cut-off blue tip).
20. Chill the tube on ice for 5–10 min and check for the completeness of the agarose-gel digest.
21. Centrifuge the digest at maximum speed for 15–20 min.
22. Prepare a Petri dish with 40 ml of *YAC microinjection buffer*. Carefully place (i.e., use Millipore flat forceps) a Millipore dialysis filter floating on the buffer surface with the glossy side up.
23. Carefully spot the digested agarose with YAC DNA liquid solution from Subheading 8.4.2, **step 21** ($<200\ \mu\text{l}$) onto the center of the Millipore dialysis filter. Allow the dialysis to proceed quietly, without any shaking or movement, for 2–3 h.

24. Carefully, pipette off the solution (using a cut-off yellow tip), and transfer the YAC DNA solution into a sterile Eppendorf tube. This forms the stock YAC DNA solution. Recoveries between 50 and 70% of the original volume spotted onto the dialysis filter are normal. Store the YAC DNA stock solution at 4°C, do not freeze, and do not centrifuge more than very brief spins (1–2 min, full speed).
25. Measure the concentration of the YAC DNA stock solution using a spectrophotometer (i.e., a NanoDrop), or better, a fluorometer, and then confirm the obtained concentration on a standard horizontal agarose gel stained with EtBr, where previously obtained YAC DNA preparations can be added as a reference. Do not allow the samples to enter more than 2–3 cm into the gel matrix (Fig. 8.3d). The entire procedure should yield YAC DNA preparations at concentrations ranging between 5 and 20 ng/μl.
26. The integrity of the YAC DNA molecules can be checked by loading an aliquot of the preparation into a PFGE or, when available, by analyzing the presence of intact globular DNA molecules at the level of electron microscopy, as described [25].
27. YAC DNA solutions should be microinjected at around 1–2 ng/μl. Use *YAC microinjection buffer* to dilute out the original YAC DNA stock solution. Additional dilution (in ½ steps) might be required if embryo toxicity is observed (>50% embryos failing to divide and develop to 2-cell eggs after microinjection). YAC DNA samples can be efficiently microinjected down to 0.5 ng/μl of DNA. Lower YAC DNA concentrations may result in zero transgenic animal births.

8.4.3. Purification of YAC DNA with Ultrafiltration Units

This is a method alternative to the two gel steps procedure, described in Subheading 8.4.2.

1. Follow Subheading 8.4.2 exactly as described up to Subheading 8.4.2, step 6.
2. Then, jump to Subheading 8.4.2, step 12, thereby avoiding the steps describing the second gel run (Subheading 8.4.2, steps 7–11), and proceed normally until Subheading 8.4.2, step 21. In this case, the agarose slice containing the YAC DNA will be larger, coming directly from the PFGE gel run, and hence, we recommend cutting it down to 4–5 pieces and distribution into separate Eppendorf tubes, for better melting and digestion processes.
3. After checking for completeness of the agarose digestion and finishing the centrifugation step (Subheading 8.4.2, step 21) you can combine all YAC DNA liquid solutions into one single tube for further processing. Reserve an aliquot for DNA

quantification purposes and for calculating the enrichment factor after the concentration achieved by the ultrafiltration units.

4. Transfer up to 400 μ l of the digested agarose solution containing YAC DNA into each upper reservoir of a Millipore ultrafiltration unit (Fig. 8.1b), and centrifuge for 2 min at 3,800 g. Check the amount of liquid that has gone through the membrane (lower reservoir). This liquid should not contain YAC DNA, since that will remain in the upper reservoir of the unit.
5. Continue with additional centrifugation steps (in rounds of 2 min, at 6,000 rpm) until about 320 μ l (out of the initial 400 μ l) have passed through the membrane (there should be about 80 μ l left in the upper reservoir).
6. Incubate the tubes at 4°C for a few hours (i.e., overnight). Resuspend the YAC DNA (possibly attached to the surface of the membrane) by pipetting up and down with a cut-off yellow tip (maximum 2–3 times) very carefully and slowly.
7. Collect all concentrated volumes and combine the resulting volume of concentrated YAC DNA solution into one single tube.
8. Proceed with the dialysis step on floating Millipore filters as described in Subheading 8.4.2, **steps 22–27**, including the measurement of YAC DNA concentration (compare it with the value obtained in Subheading 8.4.3, **step 3**) and the assessment of YAC DNA integrity, as indicated before. A concentration factor of 5–7 times is expected.

8.5 Discussion

We have described a method for obtaining agarose plugs carrying YAC DNA (Subheading 8.4.1) and two methods for isolating the YAC DNA from the agarose plugs, using a two consecutive gel steps (Subheading 8.4.2) or ultrafiltration units (Subheading 8.4.3).

Regarding the yield of the procedures, you should expect to produce 75 to 100 \times 80- μ l agarose plugs from 200 ml of saturated yeast cell culture (Subheading 8.4.1). This should be plenty of plugs for subsequent YAC DNA preparation and for any associated tests.

Subsequently, each YAC DNA preparation experiment will require about 8–10 agarose plugs and will produce (Subheading 8.4.2) 150–200 μ l of a 5–20 ng/ μ l YAC DNA solution. Therefore, the expected total yield of the entire process can vary between 1 and 4 μ g of YAC DNA/200 ml of saturated

yeast culture. Using ultrafiltration units (Subheading 8.4.3), this alternative procedure can yield YAC DNA preparations with higher concentrations (10–60 ng/ μ l). However, getting the YAC DNA back into solution can be more cumbersome if it gets attached to the membrane of the ultrafiltration units, and overly aggressive attempts for resuspension may lead to shearing of the YAC DNA sample. On the positive side, the ultrafiltration method can be easily applied to the concentration of BAC DNA solutions from PFGE agarose slices, after separation from vector sequences.

Alternative methods have been developed to increase the yield of YAC DNA during the amplification and purification steps [2, 36]. Targeted genetic modification of YAC DNA vector sequences by homologous recombination in yeast cells may allow the accumulation of several copies of the YAC DNA molecules per yeast cell (normally there should be only one copy of YAC DNA per yeast cell), thereby resulting in a potential higher yield. This introduces the opportunity to apply higher dilution factors, resulting in cleaner YAC DNA preparations and therefore eventually translating into higher efficiencies of transgenesis (i.e., up to 10% of transgenic pups born, [36]). However, the presence of several copies of YAC DNA molecules per yeast cell will also impact on the ease by which they can be further modified by homologous recombination (i.e., [37]).

**8.5.1. Notes to
Subheading 8.4.1:
Preparation of Agarose
Plugs Carrying YAC
DNA**

The right amount of yeast cell culture must be used, as recommended in Subheading 8.4.1, **step 1** and Subheading 8.4.1, **step 2**. Overloading the process with larger quantities of yeast culture, will increase the risk of producing a YAC DNA preparation with larger quantities of co-purified contaminants that will be difficult to remove and will impact in the survival ratio of the microinjected mouse embryos.

In the spheroplasting step (Subheading 8.4.1, **step 9**), the enzymes will degrade the yeast cell wall and convert the yeast cells into spheres, hence the name “spheroplasting”. This is one of the most important steps determining the quality and yield of the DNA. An inefficient spheroplasting step will result in very poor yield (not enough yeast cells will be exposed to the cell lysis steps to follow). Correspondingly, overdigesting the sample or using enzymatic batches of lower quality, might result in DNA degradation and/or bad electrophoretic mobilities. Using an enzyme of the highest quality is strongly recommended. Zymolyase (MP Biologicals) enzymatic preparations can be very expensive, but it is worth investing the money and purchasing the best enzymes for this fundamental step in YAC DNA preparation.

**8.5.2. Notes to
Subheading 8.4.2:
Isolation of YAC DNA
Using Two Gels**

There are two common methods devised for extracting YAC DNA from the PFGE agarose plugs, using two consecutive gels or ultrafiltration units. The first method, described in Subheading 8.4.2, involves the use of two gel electrophoresis steps [4, 33–35, 38, 39]. This is the most reliable and robust of the two methods for routinely obtaining YAC DNA of the highest quality and concentration. The first gel electrophoresis step is the PFGE. Thereafter, the cut slice of agarose containing the YAC DNA of interest is run on a standard electrophoresis at a 90° angle to the PFGE run. The YAC DNA is forced to move out of the agarose slice and to penetrate into a thicker low-melting agarose gel, thereby promoting concentration of YAC DNA molecules into a much smaller volume. The purpose of this method is to convert a “slice” of agarose into a “cube” of agarose, of a smaller volume. The volume of this cube will determine the final concentration of the YAC DNA precipitation.

Various companies make PFGE apparatus that are suitable for YAC DNA preparation. We have always used and recommend the Gene Navigator system (Fig. 8.2d, GE Healthcare Life Sciences, originally made by LKB) because it is a robust, simple and reliable apparatus. Alternatively, the various CHEF DR systems (Bio-Rad) are more sophisticated and modern but also suitable for PFGE purposes.

For better resolution and PFGE running conditions, we recommend equilibration of the YAC DNA-containing agarose plugs (from Subheading 8.4.1) with PFGE running buffer (TBE 0.5×) or TE (pH 8.0) before loading the gel. Equilibration is performed with at least four consecutive washes of 30 min each in excess of buffer. Unused and pre-equilibrated agarose plugs can be kept at 4°C for a short period of time (<1 week) if they are destined to be reloaded into another PFGE gel. Otherwise, agarose plugs should be returned to 20% NDS buffer solution or, better still, 50 mM EDTA (pH 8) solution, for long-term storage at 4°C.

Both TBE and TAE buffers are adequate and can be used for PFGE at 0.5× and 0.25×–0.50× dilutions, respectively, thereby providing the sufficient low ionic strength required to avoid overheating of the buffer during the run, while maintaining an increased DNA mobility. We have used both over the years and obtained good results with both. However, bear in mind that PFGE running conditions for TBE 0.5× will be different from TAE 0.5× buffer, since they do not share the same ionic strength.

When loading the agarose plugs into the PFGE gel (Subheading 8.4.2, step 2, Fig. 8.2c) make sure the preparative slot is centrally located and not wider than 4–5 cm, to avoid smiling of the chromosomal bands, which will later interfere with the exact determination of DNA band position and might result in decreased yield and lower DNA concentrations. The PFGE gel must be kept wet, with excess of PFGE running buffer during the

entire loading procedure, to avoid drying out the agarose gel matrix (Fig. 8.2a). Agarose plugs are best retrieved from solution and loaded into the preparative slot of the PFGE handling with single-use sterile plastic inoculating loops (Fig. 8.2a–c). The agarose plugs should occupy the entire height of the gel, therefore it may be necessary to trim off (with a sterile single-use scalpel) some of the agarose plug to prevent DNA from coming off the plug and running over the gel, instead of through the gel, resulting in aberrant electrophoretic images (Fig. 8.2b). When pouring and casting the PFGE gel and when running the PFGE gel inside the PFGE chamber, make sure all are absolutely level (you can use a spirit level to confirm exact positioning), in order to avoid any loss of DNA during the gel run. All agarose used for PFGE purposes must be of the highest quality (GTG) and have a low-melting point (LMP). Excellent results are obtained with SeaPlaque (Lonza) agarose.

There are many PFGE running conditions, according to the equipment used and the YAC chromosomal band size to be resolved. A wide range of chromosomal sizes (50–2,000 kb) can be recovered at the Gene Navigator system by using $0.5\times$ TAE buffer at 10°C , running at 180 V with a pulse of 30 s for 12 h followed by a pulse of 60 s for 15 h. Other suitable PFGE programs for the Gene Navigator system are as follows: (a) for optimally separating 250 kb YACs you can use $0.5\times$ TBE at 250 V and 10°C with 6 h at 9 s pulses followed by 12 h at 15 s pulses, or (b) to purify larger YACs, in the range of 500–600 kb, you can choose between $0.5\times$ TBE at 200 V during 24 h at a single pulse of 60 s and a two-pulses program of 12 h pulsing at 50 s followed by 14 h pulsing at 100 s. Avoid using too much running buffer within the PFGE tank (not more than 2 mm over the surface of the gel) to improve the quality of the chromosomal separation.

The second electrophoresis gel (Subheading 8.4.2, step 9) run can be left overnight at 40–60 V. However, it is essential to use a pump to assist the circulation of buffer. To prevent overheating, this second gel can be run inside the cold room. The agarose for the second gel must also be of the highest quality (GTG), LMP and should allow preparation of high (4%) percentage gels. Excellent results are obtained with NuSieve (Lonza) agarose.

Both sides (with marker lanes) of the second gel should be stained with EtBr to precisely identify the position of the central YAC DNA band that will have run to a similar position (Subheading 8.4.2, step 10). There are no differences in mobility in standard linear electrophoresis between chromosomal DNA bands of different size. Therefore, with a razor-blade it is possible to mark the position of the DNA in the marker lanes, which then can be used to localize the YAC DNA band. It is very important to precisely locate the position of YAC DNA. It is always better to

lose some YAC DNA by cutting closer to the concentrated core, rather than try to cover a greater area (and hence, more volume) since this will result in a more diluted YAC DNA preparation. Bear in mind that the actual volume of this agarose cube will approximate to the final volume of the liquid YAC DNA sample you will have at the end of the procedure. Usually the concentration factor achieved with this second gel run is X4–X6.

The digestion of the YAC DNA containing agarose slice with gelase is an important step, crucial for the success of the entire procedure (Subheading 8.4.2, step 18). If the enzyme is added directly from -20°C freezer it will promote the re-polymerization of the agarose and the digestion will not progress. We suggest it may be an improvement to add half of the calculated amount of units of the enzyme at the beginning of the digestion step and, after 1 h and 30 min, add the remaining half of the calculated enzyme volume, thereby facilitating the digestion of the agarose sample. Carefully pipette up and down with cut-off blue tips to allow adequate mixing of the enzyme and the melted agarose. Do not vortex the preparation nor keep it outside of the water bath for more than 5–10 s at each step, in order to avoid the re-polymerization of the agarose gel sample. The Gelase or Agarase buffers commercially provided with the enzymes are not recommended for digestion of YAC DNA containing agarose slices. Instead, straight $1\times$ TAE buffer should be used.

Checking for complete agarose gel digest (Subheading 8.4.2, step 20). This is again a very important step. The appearance of a pale brown or white opaque cloud within the tube clearly indicates that the digestion has not been complete. Sometimes you do not see white opaque tube contents, but you cannot pipette out the entire solution. This is because there is a plug at the end of the tube made of re-polymerized remaining undigested agarose. In this case, go back to Subheading 8.4.2, step 18, add more Gelase and perform a second incubation with additional enzyme.

You should aim to obtain a YAC DNA preparation of the highest possible concentration. The higher the dilution factor applied to the original YAC DNA stock solution, the better the quality of the YAC DNA microinjection sample will be, because any trace of co-purified contaminants and toxic reagents that could impair the mouse embryo development will be titrated out more effectively. For this reason, observation of embryo survival tests after microinjection are strongly recommended (Subheading 8.4.2, step 27).

8.5.3. Notes to Subheading 8.4.3: Isolation of YAC DNA Using Ultrafiltration Units

The use of ultrafiltration units is an alternative purification protocol for concentrating YAC DNA preparations without the use of a second gel (Subheading 8.4.2), described earlier. The agarose slice containing the YAC DNA of interest is melted and digested, directly as it comes from the PFGE run. The resulting YAC DNA-containing liquid solution is then concentrated by subsequent

centrifugation steps, using ultrafiltration units with a membrane pore cut-off of 30,000 MW (Fig. 8.1b). Water and small molecules can pass through the filter, whereas DNA will be retained in the upper container, in a smaller volume, therefore concentration factors of up to 6–7 times can be rapidly achieved. Ideally, YAC DNA preparations of higher concentration should be obtained (10–60 ng/ μ l). However, great care should be taken to try to recover the YAC DNA molecules that can sometimes be irreversibly attached to the filter membrane, thereby yielding YAC DNA preparations of a much lower concentration. This procedure can also be applied to BAC DNA preparations, processing excised BAC DNA-containing agarose slices from a PFGE exactly as described for YACs.

References

1. Giraldo P, Montoliu L (2001) Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res* 10:83–103
2. Schedl A, Beermann F, Thies E, Montoliu L, Kelsey G, Schütz G (1992) Transgenic mice generated by pronuclear injection of a yeast artificial chromosome. *Nucleic Acids Res* 20:3073–3077
3. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Dauwerse JG, Walker AP, Monaco AP, Butler R, Anand R, Coffey AJ, Bentley DR, Steensma HY et al (1992) Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD-gene by homologous YAC recombination. *Hum Mol Genet* 1(1):19–28
4. Schedl A, Larin Z, Montoliu L, Thies E, Kelsey G, Lehrach H, Schütz G (1993) A method for the generation of YAC transgenic mice by pronuclear microinjection. *Nucleic Acids Res* 21:4783–4787
5. Montoliu L, Umland T, Schütz G (1996) A locus control region at –12 kb of the tyrosinase gene. *EMBO J* 15:6026–6034
6. Peterson KR (2003) Transgenic mice carrying yeast artificial chromosomes. *Expert Rev Mol Med* 5:1–25
7. Forget BG (1993) YAC transgenes: bigger is probably better. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7909–7911
8. Giraldo P, Montoliu L (2002) Artificial chromosome transgenesis in pigmentary research. *Pigment Cell Res* 15:258–264
9. Fujiwara Y, Miwa M, Takahashi R, Hirabayashi M, Suzuki T, Ueda M (1997) Position-independent and high-level expression of human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic rats carrying a 210-kb YAC DNA. *Mol Reprod Dev* 47:157–163
10. Takahashi R, Ito K, Fujiwara Y, Kodaira K, Kodaira K, Hirabayashi M, Ueda M (2000) Generation of transgenic rats with YACs and BACs: preparation procedures and integrity of microinjected DNA. *Exp Anim* 49:229–233
11. Takahashi R, Ueda M (2010) Generation of transgenic rats using YAC and BAC DNA constructs. *Methods Mol Biol* 597:93–108
12. Brem G, Besenfelder U, Aigner B, Müller M, Liebl I, Schütz G, Montoliu L (1996) YAC transgenesis in farm animals: rescue of albinism in rabbits. *Mol Reprod Dev* 44:56–62
13. Langford GA, Cozzi E, Yannoutsos N, Lancaster R, Elsome K, Chen P, White DJ (1996) Production of pigs transgenic for human regulators of complement activation using YAC technology. *Transplant Proc* 28:862–863
14. Zhang XF, Wu GX, Chen JQ, Zhang AM, Liu SG, Jiao BH, Cheng GX (2005) Transfer of an expression YAC into goat fetal fibroblasts by cell fusion for mammary gland bioreactor. *Biochem Biophys Res Commun* 333:58–63
15. Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, Gearhart JD (1993) Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice. *Nat Genet* 5:22–30
16. Pearson BE, Choi TK (1993) Expression of the human beta-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10578–10582
17. Jakobovits A, Moore AL, Green LL, Vergara GJ, Maynard-Currie CE, Austin HA, Klapholz S (1993) Germ-line transmission

- and expression of a human-derived yeast artificial chromosome. *Nature* 362:255–258
18. Zou X, Xian J, Davies NP, Popov AV, Brüggemann M (1996) Dominant expression of a 1.3 Mb human Ig kappa locus replacing mouse light chain production. *FASEB J* 10:1227–1232
 19. Popov AV, Zou X, Xian J, Nicholson IC, Brüggemann M (1999) A human immunoglobulin lambda locus is similarly well expressed in mice and humans. *J Exp Med* 189:1611–1620
 20. Davies NP, Huxley C (1996) YAC transfer into mammalian cells by cell fusion. *Methods Mol Biol* 54:281–292
 21. Strauss WM, Jaenisch R (1992) Molecular complementation of a collagen mutation in mammalian cells using yeast artificial chromosomes. *EMBO J* 11:417–422
 22. Strauss WM, Dausman J, Beard C, Johnson C, Lawrence JB, Jaenisch R (1993) Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine alpha 1(I) collagen locus. *Science* 259:1904–1907
 23. Strauss WM (1996) Transfection of mammalian cells via lipofection. *Methods Mol Biol* 54:307–327
 24. Schedl A, Montoliu L, Kelsey G, Schütz G (1993) A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice. *Nature* 362:258–261
 25. Montoliu L, Bock CT, Schütz G, Zentgraf H (1995) Visualization of large DNA molecules by electron microscopy with polyamines: application to the analysis of yeast endogenous and artificial chromosomes. *J Mol Biol* 246:486–492
 26. Van Keuren ML, Gavriliina GB, Filipiak WE, Zeidler MG, Saunders TL (2009) Generating transgenic mice from bacterial artificial chromosomes: transgenesis efficiency, integration and expression outcomes. *Transgenic Res* 18:769–785
 27. Moreira PN, Giraldo P, Cozar P, Pozueta J, Jiménez A, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A (2004) Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 71:1943–1947
 28. Moreira PN, Pérez-Crespo M, Ramírez MA, Pozueta J, Montoliu L, Gutiérrez-Adán A (2007) Effect of transgene concentration, flanking matrix attachment regions, and RecA-coating on the efficiency of mouse transgenesis mediated by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 76:336–343
 29. Moreira PN, Pozueta J, Giraldo P, Gutiérrez-Adán A, Montoliu L (2006) Generation of yeast artificial chromosome transgenic mice by intracytoplasmic sperm injection. *Methods Mol Biol* 349:151–161
 30. Whitelaw CB, Springbett AJ, Webster J, Clark J (1993) The majority of G0 transgenic mice are derived from mosaic embryos. *Transgenic Res* 2:29–32
 31. Moreira PN, Pozueta J, Pérez-Crespo M, Valdivieso F, Gutiérrez-Adán A, Montoliu L (2007) Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. *Transgenic Res* 16:163–168
 32. Huxley C, Hagino Y, Schlessinger D, Olson MV (1991) The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion. *Genomics* 9:742–750
 33. Schedl A, Grimes B, Montoliu L (1996) YAC transfer by microinjection. *Methods Mol Biol* 54:293–306
 34. Umland T, Montoliu L, Schütz G (1997) The use of yeast artificial chromosome for transgenesis. In: Houdebine LM (ed) *Transgenic animals. Generation and use*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp 289–298
 35. Hiemisch H, Umland T, Montoliu L, Schütz G (1998) The generation of transgenic mice with yeast artificial chromosomes. In: Cid-Arregui A, García-Carranca A (eds) *Microinjection and transgenesis, strategies and protocols*. Springer, Berlin, pp 297–308
 36. Shen S, Harmar A, Hastie N (2006) Modification and amplification of yeast artificial chromosomes. *Methods Mol Biol* 349:67–74
 37. Giraldo P, Giménez E, Montoliu L (1999) The use of yeast artificial chromosomes in transgenic animals: expression studies of the tyrosinase gene in transgenic mice. *Genet Anal* 15:175–178
 38. MacKenzie A (2006) Production of yeast artificial chromosome transgenic mice by pronuclear injection of one-cell embryos. *Methods Mol Biol* 349:139–150
 39. Peterson KR (2007) Preparation of intact yeast artificial chromosome DNA for transgenesis of mice. *Nat Protoc* 2:3009–3015
 40. Jakobovits A, Lamb BT, Peterson KR (2000) Production of transgenic mice with yeast artificial chromosomes. *Methods Mol Biol* 136:435–453
 41. Hamer L, Johnston M, Green ED (1995) Isolation of yeast artificial chromosomes free of endogenous yeast chromosomes: construction of alternate hosts with defined karyotypic alterations. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11706–11710

